AUS DEM PFLANZENPHYSIOLOGISCHEN INSTITUT
DER UNIVERSITÄT GÖTTINGEN

WIRKUNGEN VON DIAZEPAM AUF SCENEDESMUS OBLIQUUS (GAFFRON) STAMM D_3

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Kurt Ober
aus Darmstadt

Göttingen 1973

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534919_0071

AUS DEM PFLANZENPHYSIOLOGISCHEN INSTITUT
DER UNIVERSITÄT GÖTTINGEN

WIRKUNGEN VON DIAZEPAM AUF SCENEDESMUS OBLIQUUS (GAFFRON) STAMM D_3

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Kurt Ober
aus Darmstadt

Göttingen 1973

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

D 7

Referent: Prof. Dr. F. Amelunxen

Korreferent: Prof. Dr. A. Pirson

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Juli 1973

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
(A)	1. Zusammenfassung	1
	2. Verwendete Abkürzungen und Zeichenerklärung	3
(B)	Einleitung	4
(C)	Material und Methoden	6
	1. Pflanzenmaterial und Anzuchtmethoden	6
	2. Chemikalien	9
	3. Untersuchungsmethoden	11
	(a) Zellzahlbestimmung und chemische Analysen	11
	(b) Messung der Aufnahme von Rb-86-Ionen	13
	(c) Licht- und Elektronenmikroskopie	14
	4. Statistische Sicherung	15
(D)	Ergebnisse	16
	1. Wirkungen von Diazepam auf synchronisierte Suspensionskulturen von Scenedesmus obliquus	16
	(a) Wirkungen auf die Zell-Teilungsrate	16
	(b) Wirkungen auf den Stoffwechsel	20
	- Gesamtstickstoff	21
	- DNA und RNA	22
	- Gesamtkohlenhydrat	24
	- Gesamtchlorophyll (und Absorptionsspektren der Gesamtpigmente)	27
	- Wirkungen in der Dunkelzeit des Licht-Dunkel-Wechsels	31
	- Verlauf der apparenten Photosynthese	32
	- Verhältnisse von Gesamtchlorophyll zu apparenter Photosynthese	33
	- Atmungsmessungen	35
	- Einfluß von ATP in der Nährlösung	38
	(c) Beeinflussung der Ionenaufnahme	39
	(d) Wirkungen auf die Ultrastruktur	44
	2. Wirkungen von Diazepam auf photoautotrophe und heterotrophe asynchrone Kulturen von Scenedesmus obliquus.	57

3. Wirkungen von Diazepam auf andere pflanzliche Organismen 65
(a) Anacystis nidulans 65
(b) Zell-Suspensionskultur von Petroselinum sativum 65
(c) Stehende Wasserkulturen von Pisum sativum 67
4. Wirkungen anderer Benzodiazepine auf Scenedesmus (Chlordiazepoxid und Medazepam) 69

(E) Diskussion

(F) Literaturverzeichnis 85

(G) Anhang 1 92
Anhang 2 94
Anhang 3 95

Die Vergrößerungsangaben zu den mikroskopischen Abbildungen dieser Arbeit beziehen sich auf die Exemplare im DIN A 4-Format und sind im vorliegenden DIN A 5-Format mit dem Faktor 0,7 zu korrigieren.

(A) 1. Z U S A M M E N F A S S U N G

1. Es wurden Wirkungen von 7-Chlor-1,3-dihydro-1-methyl-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on (Diazepam, Valium) auf synchron wachsende Kulturen von Scenedesmus obliquus (GAFFRON) Stamm D_3 untersucht.

2. Zum Vergleich wurde die Beeinflussung der Teilungsraten von Scenedesmus durch zwei dem Diazepam chemisch nahe verwandte Verbindungen, Chlordiazepoxid und Medazepam, festgestellt. Außerdem wurden einige Wirkungen von Diazepam auf das Wachstum von Anacystis, einer Suspensionskultur von Petroselinum-Zellen und von Pisum-Pflanzen gemessen.

3. 10^{-4} M Diazepam unterdrückt bei synchronen Scenedesmen in einem Licht-Dunkel-Wechsel die Zellteilung vollständig, vermindert aber schon von 10^{-5} M an zunehmend die Produktion von Autosporen in einem Zellzyklus.

4. Die Produktion von organisch gebundenem Stickstoff, von DNA, RNA, Chlorophyll und Kohlenhydrat ist im Verlauf eines Entwicklungszyklus durch steigende Diazepam-Konzentrationen (2 bis $8 \cdot 10^{-5}$ M) zunehmend gehemmt.

5. Die apparente Photosynthese bleibt bei $8 \cdot 10^{-5}$ und $1{,}6 \cdot 10^{-4}$ M Diazepam in der Nährlösung ebenfalls weit unter den Kontrollwerten. Darüber hinaus erhöht sich das Verhältnis von Chlorophyllgehalt zu apparenter Phyotosynthese sehr stark.

6. Eine gegenüber der Atmung im Dunkeln erhöhte Atmung im Licht wird nicht vermutet. Während die Dunkel-Atmungsrate der Kontrollen bis zum 4fachen Anfangswert in einem Licht-Dunkel-Wechsel steigt, bleiben die Raten diazepam-vergifteter Zellen etwa konstant.

Eine danach kalkulierte Bruttophotosynthese ergibt ein etwas günstigeres aber immer noch deutlich erhöhtes Chlorophyll-Photosynthese-Verhältnis.

7. Bei 10^{-3} M ATP in der Nährlösung und pH $\approx$ 4,2 werden Wirkungen von 10^{-4} M Diazepam teilweise signifikant vermindert.

8. Die Aufnahme von Rubidium-Ionen durch Scenedesmus wird durch 10^{-4} M Diazepam (auch in Gegenwart von ATP) gehemmt.

9. Mit $8 \cdot 10^{-5}$ und $1{,}6 \cdot 10^{-4}$ M Diazepam werden verschiedene Zellkonstituenten stark verändert: Aus den Plastiden verschwinden die Stärkeeinschlüsse, die dichte Packung der Thylakoide wird teilweise gelockert, es treten Plastoglobuli auf; die Mitochondrien werden bis auf das 4fache erweitert und auch die Vakuolen stark vergrößert.

10. In der Diskussion werden die unterschiedlichen Wirkungen der drei verwendeten Benzodiazepine, die Frage des Wirksamwerdens von Diazepam im Zellzyklus von Scenedesmus, die Wirkungen von Diazepam auf Photosynthese, Atmung und Ionenaufnahme sowie die Rolle des ATP besprochen. Als mögliche (primäre) Ursachen der Diazepam-Effekte werden ein Einfluß des Pharmakons auf Membransysteme der Zelle sowie Energiemangel angenommen.

2. Verwendete Abkürzungen und Zeichenerklärung

ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Ci	Curie = $3{,}7 \cdot 10^{10}$ Zerfallsereignisse pro Sekunde
cpm	Inpulse pro Minute
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNP	2,4-Dinitrophenol
dpm	Zerfallsereignisse pro Minute
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
GA	Glutaraldehyd-Fixierung
h	Stunde(n)
LDW	Licht-Dunkel-Wechsel
M	molar
min	Minute(n)
Mn	Permanganat-Fixierung (mit $KMnO_4$)
N	normal
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (reduziert)
Os	Osmiumtetroxid-Fixierung
Os+Cr	Fixierung mit OsO_4 plus $K_2Cr_2O_7$ (simultan)
p	Größe der Wahrscheinlichkeit (PÄTAU, 1943)
Pb	Nachkontrastierung am Schnitt mit Bleicitrat nach REYNOLDS (1963) oder VENABLE und GOGGESHALL (1965)
RAP	relative Autosporenproduktion
rel.ZZ.	relative Zellzahl
RNA	Ribonucleinsäure

Die Marken auf den elektronenmikroskopischen Abbildungen bedeuten 1 µm, wenn nicht anders vermerkt.

Wenn bei den Abbildungen der untersuchte Organismus nicht genannt ist, handelt es sich um Synchronkulturen von Scenedesmus obliquus.

(B) E I N L E I T U N G

Seit langem wird versucht, mit natürlichen und künstlichen Inhibitoren (Effektoren) mehr oder weniger spezifisch in den Stoffwechsel biologischer Systeme einzugreifen, um dadurch Aufschlüsse über Form-, Stoff- und Energiewechsel, sowie Transportvorgänge, Regulation und Wachstum zu erzielen. Dabei liegt das Interesse entweder mehr bei der Erforschung von Lebensabläufen oder mehr bei der Klärung der Wirksamkeit der biologisch aktiven Verbindungen - wie Arzneimittel oder Biozide (Insektizide, Fungizide usw.). Daß Pflanzen als Testobjekte verwendet werden, ist zum Beispiel bei Untersuchungen der Wirkung von Herbiziden selbstverständlich. Dies gilt aber nicht von vornherein für Arzneimittel, die bei Tier und Mensch angewendet werden - insbesondere dann, wenn sie auf spezielle Systeme wirken wie zum Beispiel auf das Nervensystem. Bei der Erforschung des Wirkungsspektrums derartiger Stoffe sollten aber pflanzliche Organismen als Testobjekte nur dann ausgeschlossen werden, wenn sie sich als ungeeignet erweisen. Als geeignet kann man ein Objekt ansehen, das wesentliche experimentelle Vorteile bietet. Dazu gehören ein einfaches biologisches System, Anzuchtbedingungen, die exakt eingehalten werden können (wie bei Objekten, die in Suspensionskultur gedeihen, dabei reproduzierbare Versuchsbedingungen ermöglichen und quantitative Messungen erleichtern), Synchronisierbarkeit und eine möglichst kurze Generationsdauer zur einfacheren Untersuchung von Entwicklungsabläufen. Danach bieten sich vor allem Mikroorganismen an, unter denen für die vorliegende Arbeit die Grünalge Scenedesmus obliquus ausgewählt wurde. Diese Art ist leicht dauersynchronisierbar, photoautotroph aber auch heterotroph kultivierbar, das Fehlen sexueller Prozesse vereinfacht

das System, und sie ist physiologisch gut untersucht.

Bisher wurden schon mehrfach Wirkungen verschiedener Pharmaka auf niedere und höhere Pflanzen untersucht. Darunter waren auch Arzneimittel, die auf das Zentralnervensystem wirken wie Thalidomid, Glutethimid, Barbiturate u.a. Dabei beschränkte man sich aber auf die Beschreibung weniger Phänomene (BONEY, 1963; GIACOMELLO et al., 1964; PARUPS und HOFFMAN, 1965; GLEISS, 1967; ARNOLD und CRUSE, 1967; PASCHKE und SCHWANITZ, 1968, 1971a, 1971b).

Die hier zu untersuchenden Pharmaka sind Benzodiazepine, besonders das Diazepam, bekannt unter dem Handelsnamen Valium^{R} "Roche". Es wirkt beim Menschen hauptsächlich angstlösend und entkrampfend, wobei die molekularen und cytologischen Wirkungsmechanismen ungeklärt sind (Übersicht bei STERNBACH et al., 1964; und ZBINDEN und RANDALL, 1967).

(C) M A T E R I A L U N D M E T H O D E N

(1) Pflanzenmaterial und Anzuchtmethoden

Die meisten Versuche wurden mit Scenedesmus obliquus (GAFFRON) Stamm D_3 (Nr. 276-6 der Algensammlung des Pflanzenphysiologischen Instituts der Universität Göttingen) durchgeführt.[1)]

Zu einigen vergleichenden Versuchen wurde Anacystis nidulans (RICHT.) DROUET[2)] (Nr. 1402-1 der oben genannten Algensammlung) verwendet.[1)]

Ebenfalls für wenige Versuche wurde eine sterile Zell-Suspensionskultur von Petroselinum sativum (HOFM.) eingesetzt[3)] (SEITZ und RICHTER, 1970).

Schließlich wurde in einem Versuch Pisum sativum L., 'Kleine Rheinländerin' als stehende Wasserkultur (SCHROPP, 1951) angezogen.

Scenedesmus wurde in 100- oder 300 ml-Kulturröhren aus Jenaer Glas mit unten ansetzendem Zuleitungsrohr für die Begasung in einem Lichtthermostaten der Fa. Fritz Kniese, Marburg/Lahn-Marbach (nach LORENZEN, 1959) kultiviert.

Die Anzuchtbedingungen waren: 30° C, Begasung durch ein Luft-CO_2-Gemisch mit ca. 3 % CO_2, Beleuchtung mit 5 Leuchtstoffröhren (3 Philips Warmton de Luxe TL 40 W - 1/32 und 2 Philips Tageslicht TL 40 W - 1/55

---

1) Herrn Dr. W. Koch danke ich für die wiederholte Bereitstellung der sterilen Algenkulturen.
2) Die von PRINGSHEIM (1968) vorgeschlagene Neubenennung (Lauterbornia nidulans) konnte sich nicht durchsetzen.
3) Herrn Dr. E. Spieß danke ich für die Überlassung des Ausgangsmaterials.

für Synchronkulturen; für die asynchronen Kulturen wurden je zwei der beschriebenen Leuchtstoffröhren verwendet). Die Beleuchtungsstärke betrug 10 kLux bei den Synchronkulturen und 7 kLux bei den asynchronen Kulturen (unmittelbar hinter der inneren Glasscheibe des Thermostaten gemessen - mit einem Luxmeter der Fa. Lange, Berlin).

Die Synchronisierung erfolgte durch einen Licht-Dunkel-Wechsel von 14:10 Stunden (MÜLLER, 1961; SENGER und BISHOP, 1967). Eine sterile Stamm-Suspensionskultur wurde bis zu 8 Monaten ununterbrochen alle zwei bis drei Tage zu Beginn der Lichtzeit auf relative Zellzahl < 10 bzw. < 1 verdünnt und zwei bis drei Tage ohne Verdünnung angezogen. (Relative Zellzahl 1 = rel. ZZ. 1 = 1 Zelle pro Zählkammer "Thoma neu" = $1{,}56 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter Suspension)

Stammkulturen mit rel.ZZ $\gg$ 100 wurden einen Tag vor Versuchsbeginn am Anfang der Lichtzeit auf rel.ZZ. = 100 verdünnt. Bei Versuchsbeginn (= Beginn der Lichtzeit) wurde allgemein auf rel.ZZ. = 100 verdünnt. Bei einigen Experimenten wurden dichtere Kulturen (vgl. MÜLLER, 1961) mit rel.ZZ. = 200 oder 300 verwendet, wobei die Kulturen vollsynchron blieben (mehr als 98 % der Zellen in Phase: LORENZEN, 1970).

Als Suspensions-Medium für Scenedesmus wurde eine Lösung anorganischer Salze (mit EDTA zur Komplexierung der Fe(II)-Ionen in der Stammlösung) in deionisiertem Wasser verwendet (KUHL, 1962). Für heterotrophe Kulturen wurde diesem Medium noch 1 % D(+)-Glucose zugegeben. Der Fe-EDTA-Komplex und die Glucose wurden mitautoklaviert. Die glucosehaltigen Lösungen wurden nur kurzzeitig bei ca. 110° C (0,5 atü) sterilisiert. Der pH-Wert dieser Medien betrug 5,8 bis 6,0.

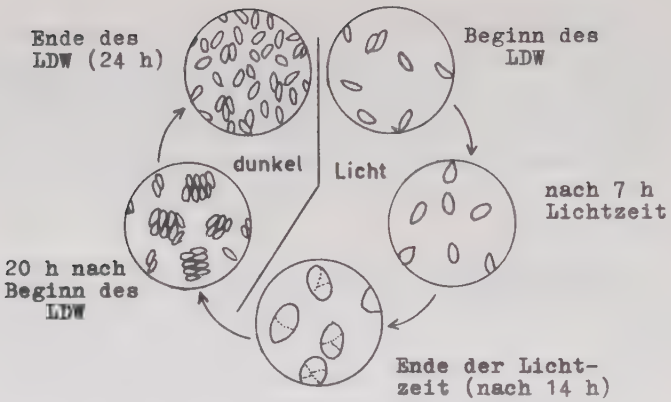


Abb. M 1

Zellformen von Scenedesmus obliquus zu verschiedenen Zeiten des Licht-Dunkel-Wechsels (LDW); verändert nach BISHOP und SENGER (1971); schematisch.
Die Veränderung der Zellzahl im Verlauf des LDW folgte im wesentlichen den von SENGER (1970) angegebenen Werten. Die Autosporen wurden 18 bis 20 Stunden nach Beginn des LDW freigesetzt. Eine in wenigen Versuchen beim Beginn der Dunkelzeit festgestellte Erhöhung der Zellzahl um ca. 20 % gegenüber der Ausgangszellzahl am Beginn des LDW konnte bei wiederholten Zählungen nicht bestätigt werden.

Anacystis wurde in dem von BOTHE (1968) veränderten Medium nach KRATZ und MYERS (1955) angezogen. Die Zusammensetzung ist bei LORENZEN und VENKATARAMAN (1969) angegeben; allerdings wurde in der vorliegenden Arbeit eine $2{,}5 \cdot 10^{-5}$ M Fe-Ionenkonzentration verwendet. K_2HPO_4 wurde mitautoklaviert. Der pH-Wert liegt dann bei 7,8. Die Anzuchtbedingungen waren sonst die gleichen wie bei asynchronen Kulturen von Scenedesmus (30° C, 7 kLux, 3 % CO_2).

Die Zell-Suspensionskultur von Petroselinum wuchs in vollsynthetischem Medium (SEITZ und RICHTER, 1970). Die Zusammensetzung des Mediums ist im Anhang 1 wiedergegeben. Die Anzucht erfolgte steril in 100 ml-Kulturröhren bei 30° C im Dauerdunkel mit Luftbegasung. Dabei wurde der Lichtthermostat wie bei der Algenanzucht verwendet.

Die Sterilität der Kulturen wurde lichtmikroskopisch (im Hellfeld und Phasenkontrast) kontrolliert.

Pisum-Samen wurden auf feuchtem Filtrierpapier angekeimt und mit ca. 3,5 cm Wurzellänge als stehende Wasserkultur (SCHROPP, 1951) weiter angezogen. Dazu wurden die Wurzeln der Pflanzen jeweils durch ein Loch eines Kunstschwammstopfens in ein mit Mineralsalz-Medium gefülltes 20 ml-Reagenzglas gehängt. Die Zusammensetzung des Mediums ist im Anhang 2 angegeben.

(2) Chemikalien

7-Chlor-1,3-dihydro-1-methyl-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on (Diazepam, Valium^{R} "Roche"),

7-Chlor-2-methylamino-5-phenyl-3H-1,4-benzodiazepin-4-oxid (Chlordiazepoxid, Librium^{R}) als Hydrochlorid

und

7-Chlor-2,3-dihydro-1-methyl-5-phenyl-1H-1,4-benzodiazepin (Medazepam, Nobrium^{R})

wurden von der Fa. Hoffmann-La Roche AG, Grenzach, bereitgestellt.

Von diesen Pharmaka wurden jeweils unmittelbar vor Versuchsbeginn 1 mM Stammlösungen mit der normalen Nährlösung als Lösungsmittel hergestellt. Um Diazepam und Medazepam schnell in Lösung zu bringen, wurde gleich-

zeitig mit der Nährlösung die - im Verhältnis zur Droge - 10fache Anzahl Mole HNO_3 als 1 N HNO_3 zupipettiert. Anschließend wurde das pH mit 1 N KOH (bzw. NaOH bei Anacystis) wieder auf 5,8 bis 6,0 (bei Medazepam auf 5,7) eingestellt. (Die Diazepam-Stammlösung für Anacystis wurde auf pH = 7,8, die für Petroselinum auf 5,0 und die für Erbsen auf 5,5 eingestellt.) Die Stammlösungen wurden, wenn sie für heterotrophe Kulturen verwendet werden sollten, einmal kurz aufgekocht und im Eisbad wieder abgekühlt.

Diese hier beschriebenen Prozeduren wurden mehrmals für die Kontrollen ohne Pharmakon ausgeführt, um sicherzustellen, daß dadurch keine Wirkungen auf die gemessenen Werte der Kontrollen ausgeübt werden.

Chlordiazepoxid·HCl konnte direkt in der Nährlösung zu 1 mM aufgelöst werden. Das pH wurde mit ca. derselben Anzahl Mole KOH (als 1 N KOH) auf 5,8 bis 6,0 eingestellt.

Die Stammlösungen wurden dann in entsprechenden Mengen zu den Nährlösungen pipettiert. Der pH-Wert der Nährmedien wurde in Stichproben zu Beginn und Ende der Versuche immer wieder kontrolliert.

Adenosin-5'-triphosphat als Dinatriumsalz, p.a. (ATP) von der Fa. Serva, Heidelberg, wurde mit H_2O bidest. als 0,1 M Stammlösung angesetzt und so zu den Kulturmedien gegeben. In entsprechender Konzentration wurde Adenosin p.a. (Serva) zusammen mit H_3PO_4 und NaH_2PO_4 als "hydrolysiertes ATP" angesetzt.

Rubidium-86 als $^{86}RbCl$ vom Radiochemical Centre, Amersham, über Fa. Buchler & Co., Braunschweig, wurde in einer bei t = 0 auf 0,2 mCi/ml H_2O verdünnten Stammlösung mit 24,8 µg Rb/ml innerhalb einer Halbwertszeit verwendet.

Für die Eichkurven zur Nucleinsäurebestimmung im Anhang 3 wurden 2-Desoxy-D-ribose für biochemische Zwecke von der Fa. Merck, Darmstadt, und Desoxyribonucleinsäure, reinst aus Kälberthymus der Fa. Serva, Heidelberg, verwendet.

(3) Untersuchungsmethoden

(a) Zellzahlbestimmung und chemische Analysen

Die relative Zellzahl wurde mit der Zählkammer "THOMA neu" ermittelt.

Das Gesamtchlorophyll wurde mit 95 %igem Methanol 30 min wie von LORENZEN (1963) beschrieben - jedoch bei 60° C extrahiert und im Überstand durch photometrische Messung (Carl Zeiss M 4 Q III mit PMQ III) bei 650 und 665 nm nach MACKINNEY (1941) bestimmt:

$$2{,}55 \cdot 10^{-2} \cdot E_{650} + 4 \cdot 10^{-3} \cdot E_{665} = \text{Chlorophyllmenge (mg/ml)}$$

In einigen Versuchen wurden die Zellen vor der 60°-Extraktion in eisgekühltem Methanol mit Ultraschall vorbehandelt (Sonifier von Branson Sonic Power, Bransons Instruments, Danbury, Connecticut).

Spektren der so gelösten Pigmente und andere Spektren wurden mit dem Unicam SP 1800 Ultraviolett Spektralphotometer aufgenommen. Schichtdicke der Lösungen stets 1 cm bei allen photometrischen Bestimmungen.

Der Kohlenhydratgehalt der Zellen wurde nach der Reaktion mit Anthron durch photometrische Messung (Gerät wie bei Chlorophyll) bei 620 nm bestimmt (ROE, 1955).

Der organische Gesamtstickstoff wurde mit der Mikrokjeldahl-Methode durch Titration des NH_3 mit 1/200 N H_2SO_4 bestimmt (vgl. BRADSTREET, 1965).

Die Nucleinsäuren (DNA und Gesamt-RNA) wurden nach WANKA (1962) mit der Veränderung von WANKA und GERAETS (1972) extrahiert und bestimmt: Photometrische Messung nach Reaktion des Extrakts mit Diphenylamin (BURTON, 1956) bzw. Orcin (CERIOTTI, 1955).

Extraktionsversuche nach RUPPEL (1962) ergaben nur extrem niedrige DNA-Werte. Das wird auf die hohe Zerstörungsrate der DNA-Bausteine - speziell der Desoxyribose - durch zu hohe Perchlorsäure-Konzentrationen und zu hohe Temperatur bei dieser Extraktionsmethode zurückgeführt (vgl. WANKA, 1962), was durch die Eichkurven im Anhang 3 bestätigt wird.

Sauerstoffproduktion und -aufnahme durch Photosynthese und Atmung wurden polarographisch bei 30° C mit der Clark-Elektrode gemessen (Biological Oxigen Monitor, Yellow Springs Instruments Co, INC., Modell 53; oder Rank Brothers, Bottisham, England). Die Absolutwerte wurden nach

$$S\frac{P}{760}(1 - 0{,}0048 \cdot K) = O_2\text{-Konzentration (mg/l)}$$

berechnet, wobei S = Sättigungswert für O_2 in H_2O (mg/l) bei 760 Torr Gesamtdruck von wasserdampfgesättigter Luft bei bestimmter Temperatur aus der Tabelle von TRUESDALE et al. (1955) entnommen wurde; P = absoluter Luftdruck zur Meßzeit (Torr); K = Salzgehalt der Probe (g/l), hier 2 g/l.

Die Meßzeit betrug bei Photosynthese-Bestimmungen 6 bis 10 min, bei Atmungsbestimmungen mindestens 10 min. Die Photosynthesemessung erfolgte bei 10 kLux Beleuchtungsstärke durch eine Philips Comptalux 150 W-Lampe.

(b) Messung der Aufnahme von Rb-86-Ionen

(vgl. Abschnitt C 2, S. 10: Chemikalien)

Zur Bestimmung der Nettoaufnahme von Rb^+-Ionen wurden Scenedesmus-Synchronkulturen zu Beginn der Lichtzeit bei rel.ZZ.= 100 (einmal bei 300) mit 0,1 bis 1,0 µCi Rb-86 pro ml Nährlösung angezogen und in 10 ml-Proben nach 0,5; 2; 5 und 14 h geerntet. Die Proben wurden 3 mal mit 10 ml H_2O bidest. gewaschen und dann verascht. Dazu wurden die Zellen mit 1 ml H_2SO_4 konz. für 0,5 h auf ca. 250° C erhitzt, nach dem Abkühlen mit 5 Tropfen 30 %igem H_2O_2 versetzt und erneut bis zur vollständigen Entfärbung der Proben und Zersetzung des H_2O_2 erhitzt und mit H_2O bidest. auf 10 ml aufgefüllt.

Diese Meßlösungen wurden in 21 ml-Polyäthylen-Zählfläschchen (Fa. Werner Zinsser, Frankfurt/M.) überführt und im Nuclear Chicago Mark I Flüssig-Szintillations-Spektrometer bei 2° C mittels Cerenkov-Strahlung auf einem Kanal gemessen; Kanaleinstellung: L bis ∞, L = 0,5, Attenuator A 0,0. Chemischer Quench wurde vernachlässigt (vgl. LÄUSCHLI, 1969). Meßzeit: 10 min bzw. maximale Impulszählung: je nach Aktivität 10^4 bis 10^6 Impulse. Der Nullwert radioinaktiver Proben lag bei 32,4 cpm und wurde von den Meßwerten abgezogen. Unter diesen Bedingungen betrug die Zählausbeute (cpm/dpm) 43,4 % ± 1,1 %. Die durch die Abklingkonstante bei verschiedenen Versuchs- und Meßzeiten verursachte Minderung der Impulsraten wurde rechnerisch beseitigt.

Vergleichsweise wurden in den ersten Experimenten mit Rb-86 mehrmals Parallelkulturen der Kontrollen gemessen, die von Versuchsbeginn an mit 1 % Glutaraldehyd oder zum Zeitpunkt der Probenentnahme mit 0,2 % $KMnO_4$ fixiert wurden. Die Zählraten dieser Parallelen betrugen z.T. bis über 20 % der Zählraten von unfixierten Kontrollen. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um Reste des vor der $KMnO_4$-Fixierung oder trotz der Glutaraldehyd-Fixierung aufgenommenen Rb - im ersten Fall entsprechend

den unfixierten Kontrollen, im zweiten Fall vielleicht durch Ionenaustauscher-Effekte in den Zellen. Der Anteil unspezifischer Adsorption von Rb^+ in der Zellwand ist wahrscheinlich sehr gering (vgl. JUNG et al., 1965; SOLT et al., 1971). Aus diesen Gründen schien es nicht erforderlich, die Zählraten von fixierten Proben bei der Auswertung zu berücksichtigen.

(c) Licht- und Elektronenmikroskopie

Zu lichtmikroskopischen Aufnahmen wurden Brown'sche Bewegungen der Zellen mit ca. 0,5 % Agar unterdrückt. Mikroskop: Leitz Ortholux.

Elektronenoptisch wurde nur Scenedesmus obliquus an Ultradünnschnitten untersucht. Die Fixierung der Zellen erfolgte entweder:
1.) mit 1 %igem Glutaraldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer, pH = 7,2; 1 h bei Zimmertemperatur und nach 3 bis 4maligem Waschen im Puffer (über mindestens 18 h bei 4° C) in 1 %igem OsO_4 plus 1,1 % $K_2Cr_2O_7$ in H_2O bidest., 1 h bei Zimmertemperatur (verändert nach SCHNEPF et al., 1971) - abgekürzt GA/Os+Cr - oder
2.) mit 5 %igem Glutaraldehyd in 0,08 M Phosphatpuffer, pH = 7,2; 1 h bei Zimmertemperatur und nach Waschen wie unter 1.) mit 0,5 %igem $KMnO_4$ in H_2O bidest., 15 min bei Zimmertemperatur - abgekürzt GA/Mn.

Jeweils nach der letzten Fixation folgte noch 3maliges Wässern mit H_2O bidest., dann wurde über Äthanol- und Propylenoxid-Stufen entwässert und in Epon eingebettet (LUFT, 1961). Die Ultradünnschnitte wurden mit dem Reichert-Ultramikrotom hergestellt, mit Bleicitrat nach REYNOLDS (1963) oder VENABLE und GOGGESHALL (1965) nachkontrastiert (abgekürzt Pb) und mit dem Philips EM 200 oder Carl Zeiss EM 9a mikroskopiert.

(4) Statistische Sicherung

Wo es erforderlich erschien, wurde zur Sicherung von Unterschieden zwischen Mittelwerten zweier Messungsreihen der t-Test verwendet (PÄTAU, 1943). Mit Ausnahme der Versuche an asynchronen Scenedesmus-Kulturen sind alle Werte mindestens aus zwei oder drei Versuchen gemittelt worden. Bei größeren Schwankungen der Meßwerte von Einzelversuchen wurden wesentlich mehr (5 bis 8) Experimente durchgeführt.

(D) E R G E B N I S S E

(1) Wirkungen von Diazepam auf synchronisierte Suspensionskulturen von Scenedesmus obliquus

(a) Wirkungen auf die Zell-Teilungsrate

Als Maß der Teilungsraten von Scenedesmus wurde in Synchronkulturen - mit relativer Zellzahl = 100 zu Beginn der Lichtzeit - die Zahl der nach einem Licht-Dunkel-Wechsel (LDW) freigesetzten Autosporen bestimmt.[1)] Die Anzahl der freigesetzten Autosporen vergifteter Proben im Verhältnis zur entsprechenden Anzahl Autosporen der Kontrollen wurde als relative Autosporenproduktion (RAP) bezeichnet und in Prozent angegeben.

Die Abbildung 1 zeigt die RAP als Funktion der Diazepam-Konzentration in der Nährlösung. Diazepam wurde zu Beginn der Lichtzeit zugegeben und während der Kulturdauer (bis zum Ende des LDW) nicht wieder entfernt.

Bei 10 µM Diazepam sinkt die RAP bereits auf etwa 92 %. Mit 40 µM Diazepam bleiben die Scenedesmus-Kulturen noch zu etwa 90 % synchron, obwohl die RAP auf 78 % absinkt! (vgl. Abb. 2b)

Eine solche 40 µM-Diazepam-Kultur wurde nach jedem LDW mit 40 µM Diazepam-Nährlösung wieder auf relative Zellzahl = 100 verdünnt. Dabei blieb die Kultur über zehn Zellzyklen (bis zum Abbruch des Versuchs) zu durchschnittlich 92 % synchron, obwohl sich ihre RAP gegenüber den giftfreien Kontrollen mit $p = 0{,}003$ signifikant

---

1) Dabei wurden auch alle als individuelle Tochterzellen erkennbaren Autosporen mitgezählt, auch wenn sie noch von der nicht ganz aufgeplatzten Sporangienwand zusammengehalten wurden. Bei Normalkulturen betrug die durchschnittliche Produktion in einem LDW 8 bis 10 Autosporen pro Mutterzelle. (Vgl. Abb. M 1, S. 8)

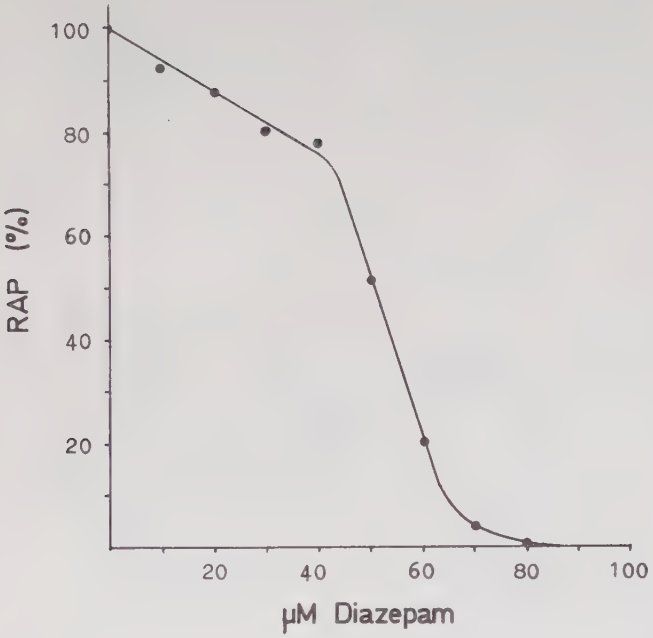


Abb.1

Relative Autosporenproduktion (RAP) in einem Licht-Dunkel-Wechsel (LDW) bei verschiedenen Diazepam-Konzentrationen in der Nährlösung.

auf durchschnittlich 68 % verminderte. Anschließend wurde diese Kultur am Ende der LDW wieder mit normaler Nährlösung verdünnt und hatte dann in den zehn folgenden Zellzyklen eine durchschnittliche RAP von 102,7 %, die mit $p = 0,78$ eine rein zufällige Abweichung von 100 % bedeutete.

Auf die stärker ansteigende Teilungshemmung oberhalb 40 µM Diazepam (Abb. 1) wird im Abschnitt D 1 b zurückzukommen sein. Bei 80 µM Diazepam finden nur noch vereinzelt Autosporenfreisetzungen statt (RAP = 0,63 %), obwohl einige Zellen am Ende des LDW lichtmikroskopisch geteilt erscheinen (Abb. 2d). Bei 100 µM Diazepam wurde in keinem Fall von zwölf Versuchen eine Zellteilung oder gar Autosporenfreisetzung mehr beobachtet (Abb. 2e).

40, 80 und 100 µM Diazepam wurden noch öfter als Grenzwerte teilungshemmender Konzentrationen in weiter unten beschriebenen Untersuchungen verwendet.

Wird im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Versuchen Diazepam nicht zu Beginn des LDW sondern erst im Verlauf der Lichtzeit appliziert, so ergibt sich für 80 µM Diazepam die in Abbildung 3 dargestellte Abhängigkeit der RAP vom Zeitpunkt der Zugabe des Pharmakons: Entsprechend der Abbildung 1 werden auch hier fast keine Autosporen gebildet, wenn 80 µM Diazepam zu Beginn des LDW zugesetzt worden ist (RAP = 0,63 %). Je später dann das Gift zugegeben wird, desto mehr Autosporen werden bis zum Ende des LDW freigesetzt. Wird das Diazepam erst am Ende der Lichtzeit in die Kultur gegeben, so ergibt sich gegenüber den Kontrollen nur noch ein ganz geringer Unterschied in der Autosporenproduktion (RAP = 97 %). Deshalb wurden Wirkungen der Giftzugabe n a c h Beginn der Dunkelzeit nicht weiter untersucht. (Der gestrichelte Teil der Funktion in Abbildung 3 wurde extrapoliert.) Der stärkste Anstieg der RAP (in Abb. 3) liegt zwischen 3 und 6 Stunden nach Beginn des LDW. Dadurch beträgt die RAP bereits 50 % bei Zugabe von 80 µM Diazepam nach den ersten sechs Lichtstunden.

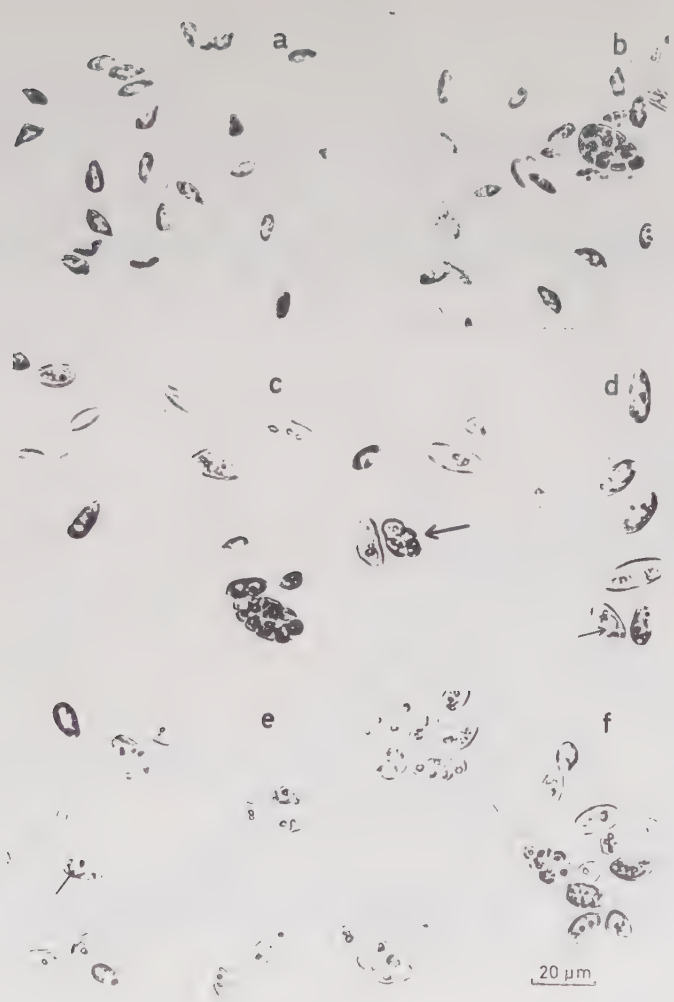


Abb.2

Scenedesmus obliquus; Synchronkultur, die über einen LDW mit verschiedenen Diazepam-Konzentrationen gewachsen ist. Überblick über die gewöhnlich auftretenden Zellformen: (a) Kontrollen (nur Autosporen), (b) 40 µM Diazepam (Autosporen und ein noch geschlossenes Sporangium), (c) 60 µM Diazepam (Autosporen, ein Sporangium und ungeteilte größere Zellen), (d) 80 µM Diazepam (fast nur ungeteilte Zellen; der starke Pfeil zeigt auf eine in 4 Tochterindividuen geteilte Zelle), (e) 100 µM Diazepam (nur kleinere, ungeteilte Zellen), (f) 100 µM Diazepam plus 1 mM ATP (ungeteilte und mehrere geteilte Zellen, vgl. Kapitel D 1 b).
Die dünnen Pfeile zeigen auf Vakuolen. 640 x

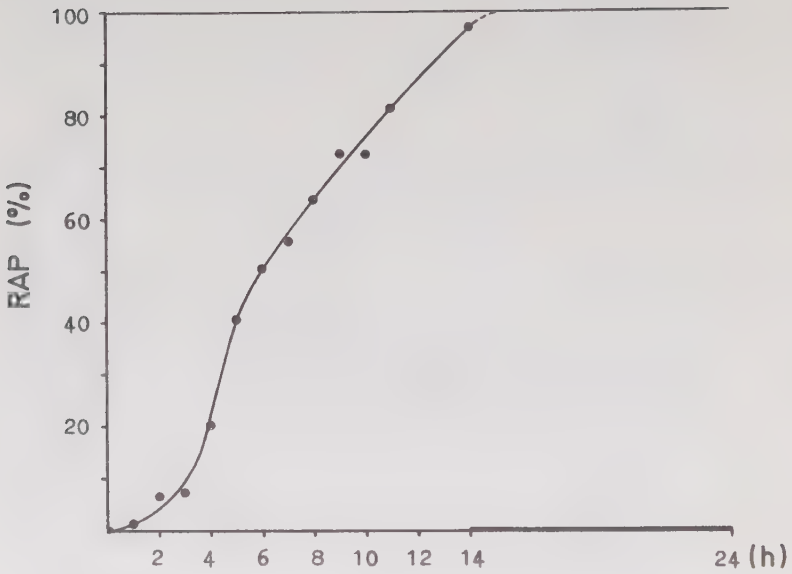


Abb.3

Relative Autosporenproduktion (RAP) als Funktion des Zeitpunktes der Applikation von 80 µM Diazepam im Licht-Dunkel-Wechsel (LDW).

(b) Wirkungen auf den Stoffwechsel

Wenn nicht anders angegeben, erfolgte bei Experimenten, die in diesem Abschnitt (D 1 b) beschrieben werden, die Applikation von Diazepam zu Beginn des LDW.

- Gesamtstickstoff

Die Zunahme des organisch gebundenen Stickstoffs im Verlauf des Zellzyklus (gemessen nach 6, 12, 14, 18 und 24 Stunden) hängt von der Diazepam-Konzentration in der Nährlösung ab. Abbildung 4 zeigt diese Abhängigkeit bei Kulturen mit relativer Zellzahl = 100 zu

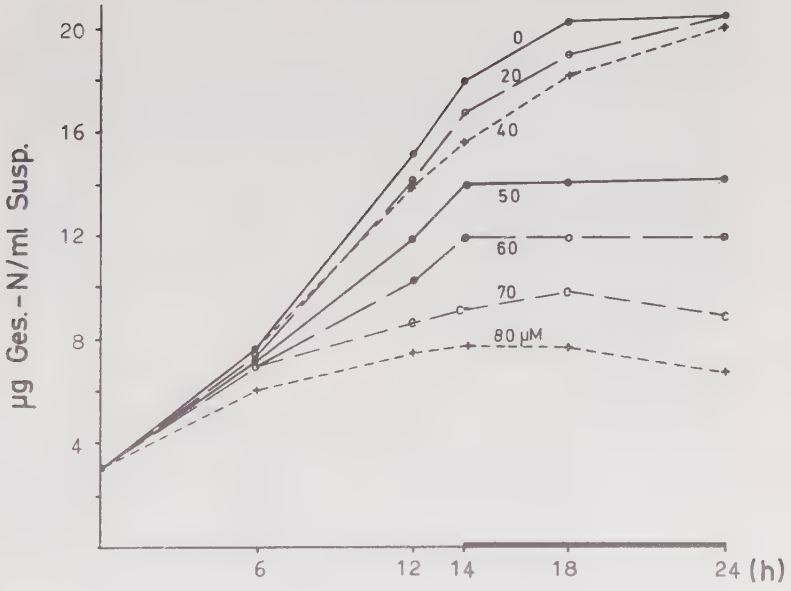


Abb.4

Gehalt der Zellen an organisch gebundenem Stickstoff (Ges.-N) während eines LDW bei verschiedenen Diazepam-Konzentrationen in der Nährlösung (rel.ZZ. = 100).

Beginn der Lichtzeit: Während die Kontrollen ihren Stickstoffgehalt im Verlauf eines LDW von 3 µg um das 6,8fache auf etwa 20,5 µg Stickstoff pro Milliliter Zellsuspension steigern können, erhöhen im selben Zeitraum die Kulturen mit 80 µM Diazepam ihre Stickstoffmenge immerhin noch um das 2,23fache. Dies ist bemerkenswert, weil bei 80 µM Diazepam die RAP nur 0,63 % beträgt (Abb. 1).

Während der Stickstoffeinbau der 80 µM Diazepam-Proben nach 6 Stunden noch 65 % der Kontrollen beträgt, liegt der entsprechende Wert nach 24 Stunden nur noch bei 21,4 %. Dieser Unterschied ergibt sich vor allem aus einer Phase gesteigerter Produktivität bei Kontrollen (und schwach vergifteten Kulturen) von der 7. Stunde des LDW an, während stärker vergiftete Zellen (ab 50 µM Diazepam) eine gleichbleibende (50 und 60 µM) oder verminderte (70 und 80 µM) Bildung von Stickstoffverbindungen aufweisen (Abb. 4). Entsprechend der besonders stark verminderten RAP oberhalb 40 µM Diazepam (vgl. Abb. 1) fällt am Ende der Dunkelzeit (ab 50 µM) auch der deutlich geringere Stickstoffgehalt gegenüber den weniger vergifteten Zellen auf.

- DNA und RNA

Die Nucleinsäurebestimmung erfolgte in Kulturen mit relativer Ausgangs-Zellzahl = 200 (vgl. Abschnitt C 3 a). Es wurde nur die 80 µM Diazepam-Konzentration mit der Kontrolle verglichen. Die Abbildungen 5 und 6 zeigen die Zunahme von DNA bzw. RNA im Verlauf des LDW.

Eine deutlich meßbare Synthese der DNA beginnt bei den Kontrollen erst nach der 6. Stunde des LDW. Während sie dann nach 14 Lichtstunden ihren DNA-Gehalt 8,5fach gesteigert haben, konnten die vergifteten Zellen ihre

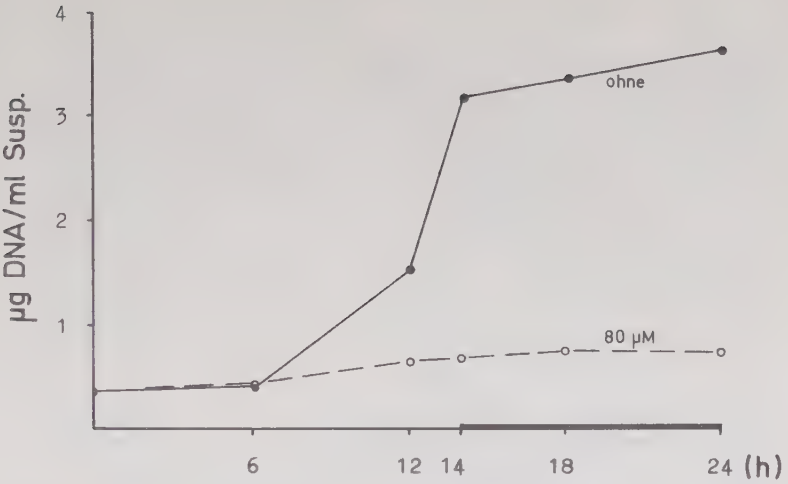
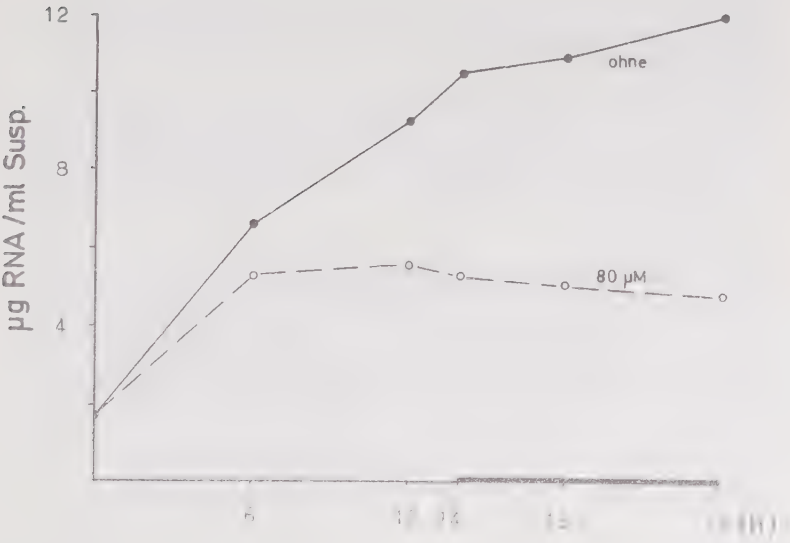


Abb.5

Nucleinsäuregehalt der Zellen während eines LDW ohne und mit 80 µM Diazepam in der Nährlösung; Abb.5: DNA, Abb.6: RNA (rel.ZZ. = 200 !).

Abb.6



DNA-Menge bis dahin nur 1,85fach vermehren. Nach der Dunkelphase des LDW betragen die entsprechenden Werte 9,7 und 2,0. Gemäß ihrer durchschnittlichen Autosporenproduktion (siehe Fußnote S. 16) erzeugen die Kontrollen also bereits in der Lichtzeit genügend DNA, um die notwendigen Kern- (und Zell-) Teilungen (im Sinne einer Teilungsinduktion - vgl. LORENZEN und RUPPEL, 1960) zu ermöglichen. Die vergifteten Zellen dagegen können sich schon wegen der geringen Neubildung von DNA nicht oder nur vereinzelt teilen.

Die RNA-Synthese der Kontrollen ist während der ganzen Lichtzeit nahezu gleichbleibend. Nach 6 bzw. 14 Lichtstunden ist die RNA-Menge 3,87 bzw. 6,20fach vermehrt worden. In der Dunkelzeit des LDW steigt der RNA-Gehalt dann nur noch bis auf das 7,07fache der Ausgangskonzentration weiter an. Bei den vergifteten Kulturen ist die RNA-Syntheserate in den ersten 6 Stunden noch nicht sehr stark (ca. 20 %) vermindert (3,11fache Menge des Ausgangswertes nach 6 Stunden). In der folgenden Zeit des LDW findet dann offenbar keine RNA-Synthese mehr statt. Dabei bleibt natürlich die Frage offen, ob ein verstärkter Abbau von RNA deren Neubildung gerade kompensiert bzw. etwas überkompensiert (Abb. 6).

Insgesamt ist durch 80 µM Diazepam die DNA-Synthese in einem LDW stärker vermindert als die RNA-Synthese.

- Gesamtkohlenhydrat

Der Kohlenhydratgehalt wurde wieder in Kulturen mit relativer Ausgangszellzahl = 100 gemessen. Den Verlauf der Zu- und Abnahme der Gesamtkohlenhydratmenge von Scenedesmus in Gegenwart verschiedener Diazepam-Konzentrationen ist in Abbildung 7 dargestellt:

Die Kohlenhydrate sind von den untersuchten Stoffwechselprodukten die einzige Substanzgruppe, die ein

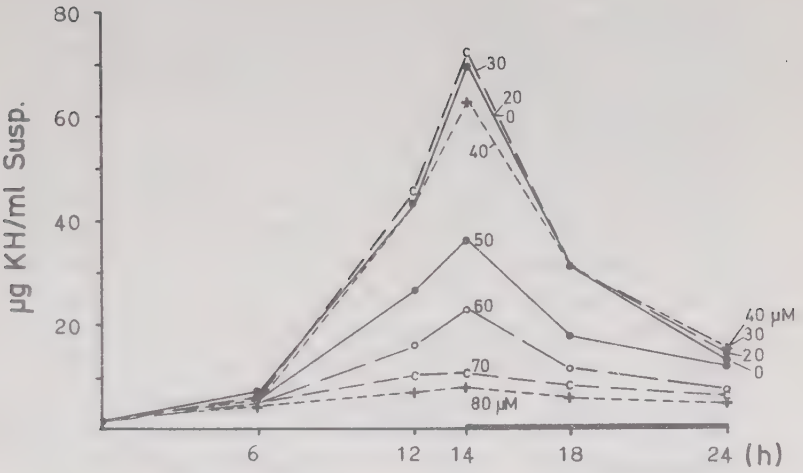


Abb.7

Kohlenhydratgehalt der Zellen während eines LDW bei verschiedenen Diazepam-Konzentrationen in der Nährlösung (rel.ZZ. = 100).

ausgeprägtes Maximum (am Ende der Lichtzeit) durchläuft. In der Dunkelphase des LDW verschwinden die Kohlenhydrat-Reserven wieder durch Veratmung und Einbau in andere Verbindungen.

Nach Abbildung 7 könnte man annehmen, daß nicht nur der Aufbau der Kohlenhydrate während der Lichtzeit, sondern auch ihr Abbau während der Dunkelzeit gehemmt sei: Die bis zur 14. Stunde divergierenden Kurven konvergieren danach wieder bis zum Ende des LDW. Die verminderte Abbaurate der Kohlenhydrate vergifteter Scenedesmen wäh-

rend der Dunkelzeit wird jedoch keine direkte Wirkung des Diazepams sein, weil eine Zugabe des Giftes am Beginn der Dunkelzeit zu Normalkulturen eher eine geringfügige Beschleunigung des Kohlenhydratabbaus bewirkt (siehe Tabelle 1, S.31).

Besonders auffällig ist schließlich der gegenüber den Kontrollen höhere Kohlenhydratgehalt schwach vergifteter Kulturen (20 bis 40 µM Diazepam) am Ende des LDW. Diese Verhältnisse konnten bei allen Versuchen festgestellt werden und sind durch Abbildung 8 wiedergegeben. Das dort erscheinende Maximum bei 30 und 40 µM Diazepam liegt mit $p = 0{,}001$ bzw. $p < 0{,}0002$ hochsignifikant über den Werten der Kontrollen. Solche Relationen konnten weder beim Gesamtstickstoff noch beim Chlorophyll (siehe unten) oder bei der relativen Autosporenproduktion festgestellt werden.

Am Ende des LDW folgt daraus ein stark erhöhter Kohlenhydratgehalt pro schwach vergiftete Autospore, wie es in Abbildung 9 dargestellt wurde.

In dieser Darstellung sind die Werte für 30 und 40 µM Diazepam allerdings extrapoliert, denn bei diesen Giftkonzentrationen blieben wenige Zellen unvollständig geteilt. Deshalb wurde aus der Zahl der dort vorhandenen, freigesetzten Autosporen berechnet, wieviele Autosporen die ungeteilten Zellen bzw. nicht aufgeplatzten Sporangien theoretisch noch hätten freisetzen können, wenn sie sich mit gleicher Rate wie die anderen Zellen geteilt hätten. Die Zahl der so insgesamt zusammengerechneten Autosporen wurde in RAP umgerechnet und als Bezugsgröße verwendet.

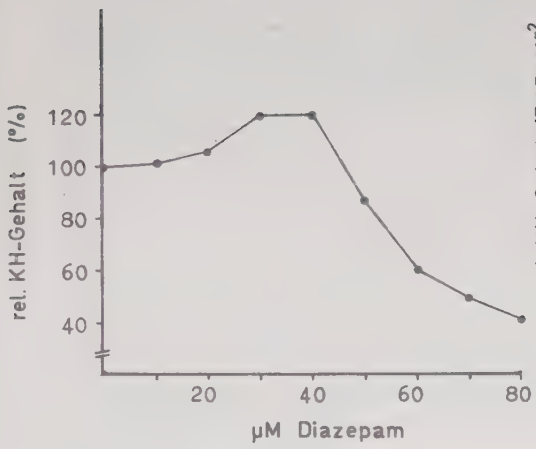


Abb.8

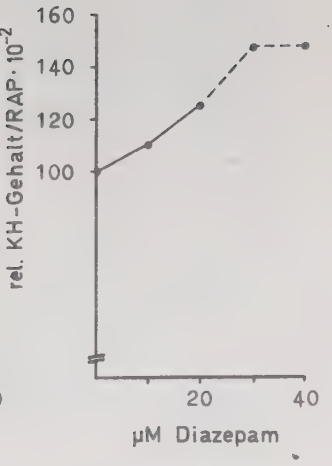


Abb.9

Abb.8: Auf das Suspensionsvolumen bezogener Kohlenhydratgehalt von diazepam-vergifteten Scenedesmen relativ zu den Kontrollen (=100 %) am Ende des LDW.

Abb.9: Auf die relative Anzahl der Autosporen (RAP) bezogener relativer Kohlenhydratgehalt am Ende des LDW. Die Werte bei 30 und 40 µM Diazepam sind auf die theoretisch mögliche Autosporenzahl (als RAP) bezogen (Erklärung im Text).

- Gesamtchlorophyll (und Absorptionsspektren der Gesamtpigmente)

Der Verlauf des Chlorophyllgehalts in diazepam-vergifteten Scenedesmus-Synchronkulturen mit relativer Ausgangszellzahl = 100 ist durch Abbildung 10 zusammenge-

faßt. Die allgemeine Verlaufscharakteristik ähnelt derjenigen des Gesamtstickstoffs.

Die Kontrollen haben am Ende der Lichtzeit den 8,4fachen, am Ende des LDW den 8,5fachen Ausgàngswert vom Beginn der Lichtzeit erreicht. Die entsprechenden Werte der mit 80 µM Diazepam vergifteten Kultur liegen bei 1,6 und 1,5.

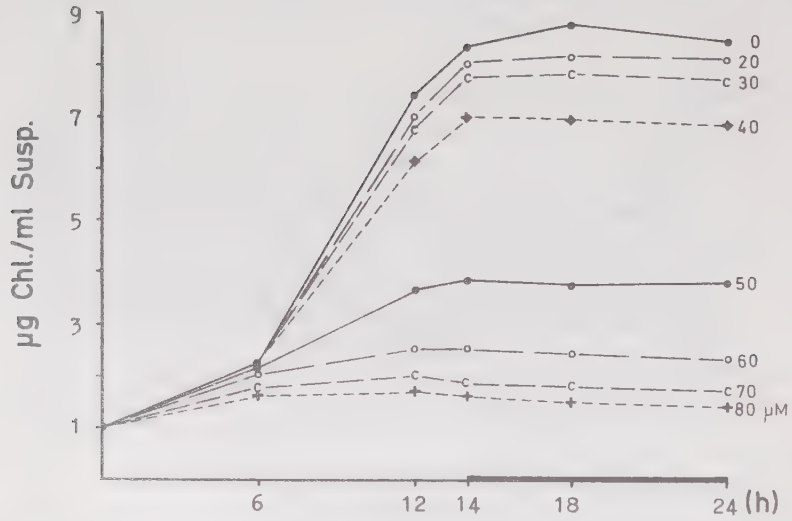


Abb.10

Chlorophyllgehalt der Zellen während eines LDW bei verschiedenen Diazepam-Konzentrationen in der Nährlösung (rel.ZZ. = 100).

Bei den ersten Versuchen, die Pigmente bei 50° C zu extrahieren, blieben die Zellrückstände um so stärker grün gefärbt, je höher die Diazepam-Konzentration in der Kultur war. Für die Kontrollen waren allerdings 50° C stets ausreichend. Erst bei 60° C konnten die Pigmente auch aus den vergifteten Zellen quantitativ herausgelöst werden.

Zellen aus asynchronen Kulturen, die mehrere Tage unter extremen Diazepam-Konzentrationen (280 µM) im Dauerlicht gehalten wurden, mußten noch kräftigeren Extraktionsmethoden unterworfen werden: Diese Zellen wurden bei 0° C in Methanol 30 sec mit Ultraschall von maximaler Energie behandelt und dann 30 min bei 60° C extrahiert. Erst danach war die Ausbleichung der Zellrückstände quantitativ und der Chlorophyllgehalt der Extrakte maximal.

Offenbar werden bei unvollständiger Extraktion vergifteter Scenedesmen auch die einzelnen Pigmente unterschiedlich gut extrahiert: Abbildung 11 zeigt die Absorptionsspektren der mit verschiedenen Methoden extrahierten Pigmente aus normalen und vergifteten, asynchronen Kulturen: Vor allem im Bereich von 350 bis 470 nm unterscheiden sich nicht nur die Pigmentspektren der Diazepam- von der Normalkultur, sondern auch die Spektren der Diazepamkultur, die nach der Anwendung verschiedener Extraktionsmethoden aufgenommen wurden. Da im roten Spektralbereich allgemein keine Differenzen zwischen den Spektren auftraten, ist anzunehmen, daß nicht Chlorophyll a und Chlorophyll b (Maximum bei 650 nm) sondern Carotinoide und Chlorophylle unterschiedlich extrahierbar waren.

Bei vollständiger Extraktion zeigen die Spektren vergifteter S y n c h r o n kulturen keine deutlichen Veränderungen im Vergleich mit den Kontrollen. Pigmenttrennungen wurden aus diesem Grund nicht vorgenommen. (Stärkere Differenzen bei Spektren von asynchronen Kulturen sind im Abschnitt D 2 beschrieben.)

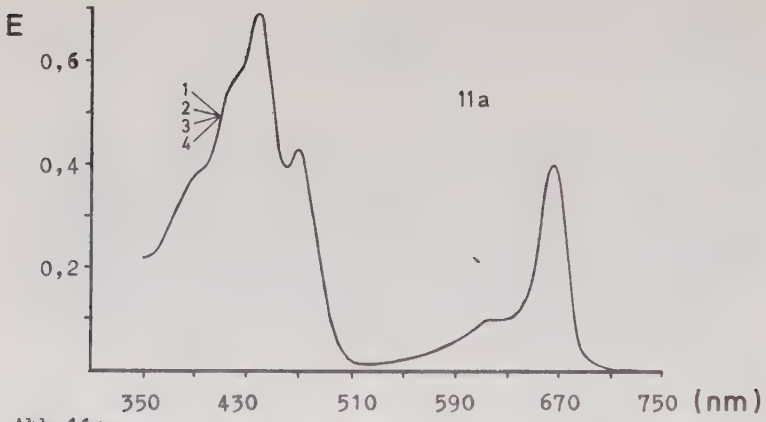
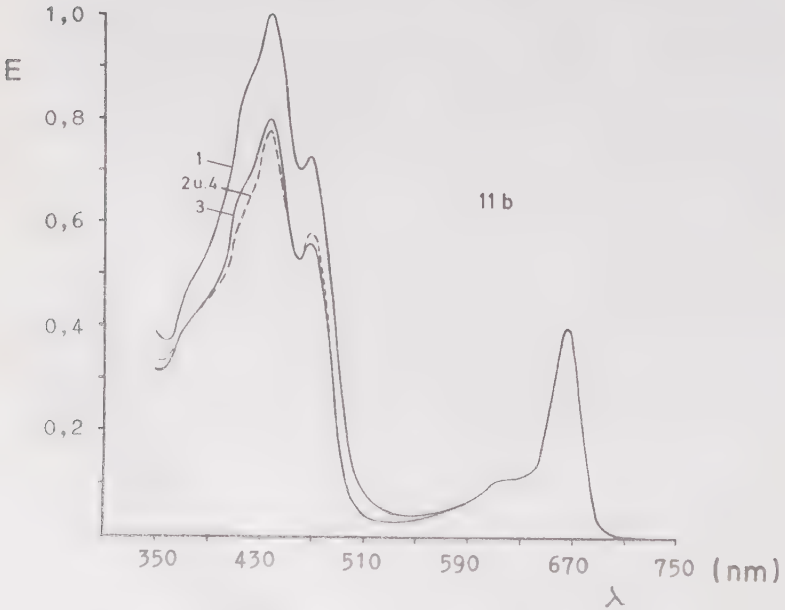


Abb.11a

Asynchrone Dauerlichtkultur von Scenedesmus (log.-Phase), 4 Tage im Dauerlicht, dabei nach 2 Tagen einmal verdünnt. Absorptionsspektrum der Gesamtpigmente in 95 % Methanol: Identische Spektren nach Anwendung von 4 verschiedenen Extraktionsmethoden: (1.) 30 min bei 50° C, (2.) 5 mal 30 sec Ultraschall, dann 30 min bei 50° C, (3.) 30 min 60° C und (4.) 5 mal 30 sec Ultraschall, dann 30 min bei 60° C (vgl. Abschnitt C 3 a).

Abb.11b

Absorptionsspektren nach Vorbehandlung entsprechend Abb. 11a von einer 4 Tage mit 280 µM Diazepam in der Nährlösung gewachsenen Kultur (Dauerlicht). Verdünnung jeweils auf gleiche Absorption bei 665 nm eingestellt.



- Wirkungen in der Dunkelzeit des LDW

Aus den Ergebnissen, die in Abbildung 3 dargestellt sind, war zu schließen, daß Diazepam in der Dunkelzeit des LDW nahezu wirkungslos bleiben müßte, wenn es erst bei Beginn der Dunkelzeit zugesetzt wird. Tabelle 1 gibt einige Effekte von 80 und 160 µM Diazepam wieder,

Bestimmung von	zu Beginn der Dunkelzeit	am Ende der Dunkelzeit		
		Kontrolle	80 µM	160 µM
rel.ZZ.	100	729	706	718
RAP (%)	-	100	97	98,5
Kohlenhydrat (µg/ml Susp.)	62,7	13,97	12,98	13,18
% gegen Kontrolle	-	100	92.9	94.3
Chlorophyll (µg/ml Susp.)	8,38	8,59	8,27	8,31
% gegen Kontrolle	-	100	96,3	96,7
Gesamtstickstoff (µg/ml Susp.)	16,45	18,91	18,59	18,29
% gegen Kontrolle	-	100	98,3	96,7

Tabelle 1

Zusammenfassung der gemessenen Wirkungen von 80 und 160 µM Diazepam auf Scenedesmus-Synchronkulturen (rel.ZZ. = 100) während der Dunkelzeit des LDW (Diazepam-Zugabe bei Beginn der Dunkelzeit).

das genau am Ende der Lichtzeit zugesetzt wurde: RAP, Chlorophyll- und Gesamtstickstoff-Gehalt liegen dann am Ende der Dunkelzeit mit 2 bis 4 % nur wenig unter den Kontrollwerten. Nur der Kohlenhydratgehalt sinkt in einem Fall etwas weiter (~ 7 %) unter den der Kontrolle.

Allerdings verändert sich in der Dunkelzeit auch die Stoffzusammensetzung der Kontrollen nicht mehr entscheidend - mit Ausnahme des Kohlenhydratgehalts. Auch die Tochterzellen sind am Ende der Lichtzeit des LDW schon zu einem großen Teil gebildet, wenn auch noch nicht voneinander isoliert. Aus den Ergebnissen der Tabelle 1 darf demnach auf keinen Fall gefolgert werden, daß Diazepam nur im Licht auf Scenedesmus wirkt. (Vergleiche dazu Abschnitt D 2)

- Verlauf der apparenten Photosynthese

Die photosynthetische Sauerstoffentwicklung - zunächst ohne Berücksichtigung von Atmungsvorgängen - wurde polarographisch gemessen und gleichzeitig von identischen Proben der Chlorophyllgehalt bestimmt. Die Versuche wurden mit Kulturen von relativer Ausgangszellzahl = 200 ausgeführt. Es wurde zu Beginn der Lichtzeit und nach 3, 6, 9, 12, 14 und 24 Stunden gemessen. 80 und 160 µM-Diazepam-Kulturen wurden mit Kontrollen verglichen. Abbildung 12 zeigt zunächst die O_2-Netto-Produktionsraten im Verlauf des LDW. Auch hier zeigt sich wieder die stark zunehmende Divergenz nach der 6. Stunde. Die 160 µM-Diazepam-Probe zeigt bereits nach der 3. Stunde einen Abfall unter den Ausgangswert; dies geschieht bei der 80 µM-Diazepam-Kultur erst nach der 9. Stunde.

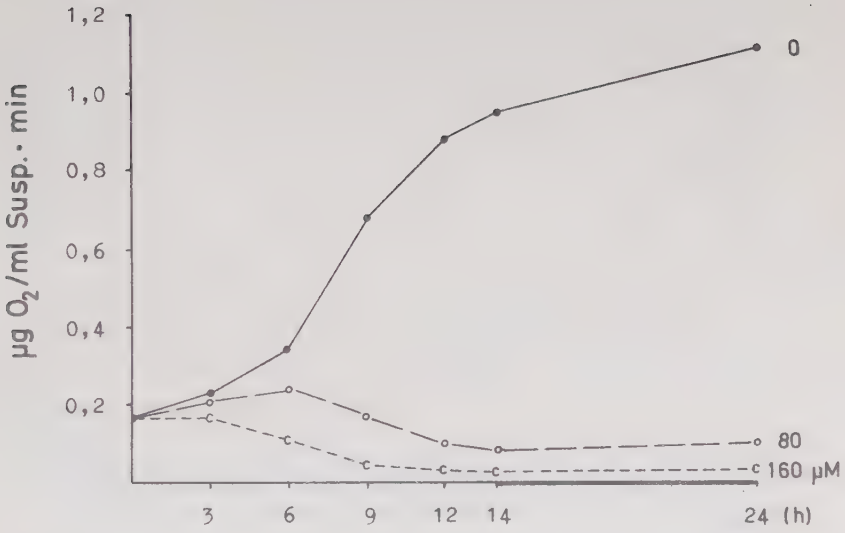


Abb.12

Apparente Photosynthese in Kulturen ohne und mit 80 und 160 µM Diazepam während eines LDW (rel.ZZ. = 200; 10 kLux).

- Verhältnisse von Gesamtchlorophyll zu apparenter Photosynthese

Der zuletzt beschriebene Abfall unter den Ausgangswert kann beim parallel gemessenen Chlorophyllgehalt während der Lichtzeit nicht festgestellt werden (Abbildung 13). Nur die 160 µM-Diazepam-Probe sinkt zum Ende des LDW etwas unter den Anfangswert. Es ergeben sich daraus die

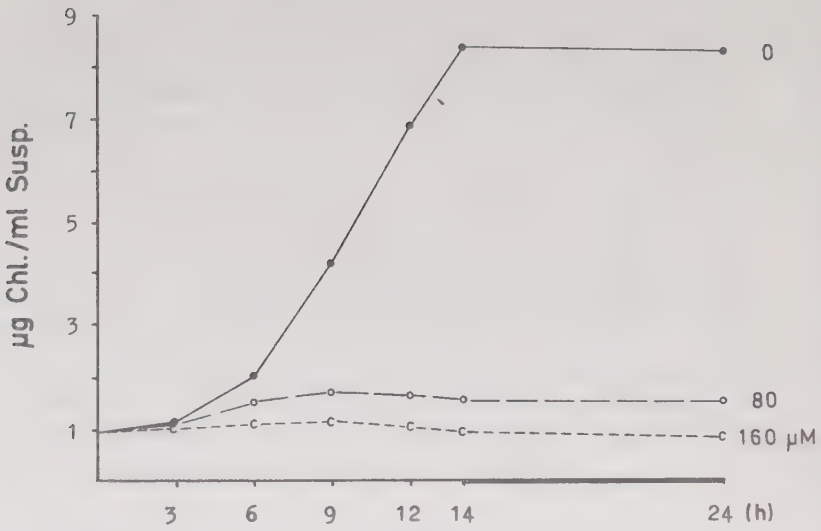


Abb.13
Chlorophyllgehalt in Kulturen ohne und mit 80 und 160 µM Diazepam während eines LDW (rel.ZZ. = 200).

in Abbildung 14 aufgetragenen Verhältnisse von Chlorophyllmenge zu O_2-Produktionsrate. M.a.W.: Es enthalten die vergifteten Zellen - besonders zur 12. bzw. 14. Stunde - im Vergleich zu den Kontrollen mehr Chlorophyll als für die jeweilige O_2-Produktionsrate erforderlich wäre.

Damit stellt sich die Frage, ob - bezogen auf die verfügbare Chlorophyllmenge - der Photosyntheseapparat vergifteter Zellen weniger leistungsfähig ist als der-

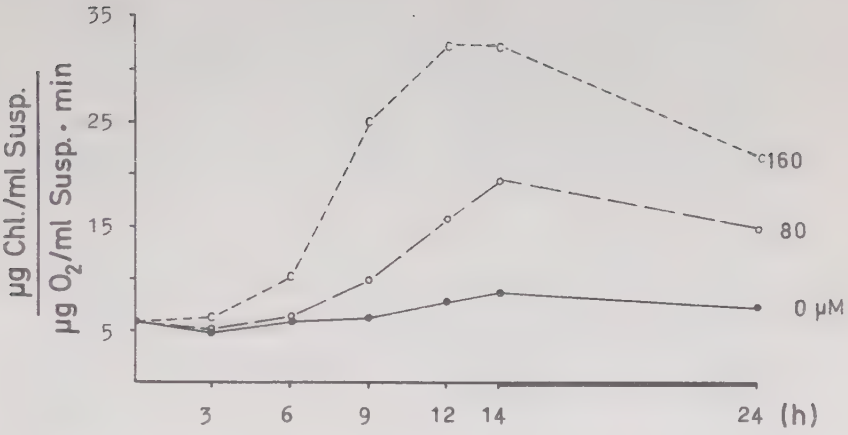


Abb.14

Verhältnisse von Chlorophyllgehalt zur Netto-Sauerstoffproduktion während eines LDW in Kulturen ohne und mit 80 und 160 µM Diazepam in der Nährlösung (rel.ZZ. = 200).

jenige unvergifteter Zellen, oder ob ein gegenläufiger O_2-Verbrauch, besonders durch eine gesteigerte Atmungsrate in vergifteten Kulturen, die Netto-O_2-Produktion im Licht entsprechend herabsetzt.

- Atmungsmessungen

Der Sauerstoffverbrauch wurde ebenfalls in Kulturen mit relativer Ausgangszellzahl = 200 gemessen. Nach 4 min Dunkeladaptation in der Meßküvette wurden die Algen 5 min mit ca. 10 kLux bestrahlt. Danach wurde über 10 min der O_2-Verbrauch im Dunkeln gemessen. Über diese Dauer (wenn gemessen, sogar über 20 bis 30 min) blieb

die O_2-Konzentrationsabnahme fast immer konstant. Jedenfalls wurde niemals nach Ausschalten des Lichts ein kurzfristig erhöhter O_2-Verbrauch wie von BRACKETT et al. (1953) oder DAMASCHKE (1958) festgestellt - analog zu einem häufiger bei höheren Pflanzen beschriebenen verstärkten CO_2-Ausstoß nach Belichtung (Übersicht bei ZELITCH, 1970). Da sonst keine weiteren Beobachtungen zur Bestimmung einer eventuell ablaufenden Photorespiration angestellt wurden, wird unter allem Vorbehalt die hier in Abbildung 15 dargestellte Atmungsrate auch als die zuvor im Licht stattfindende O_2-Aufnahme angesehen. (Auf die kontroversen Auffassungen über die Lichtatmung bei Algen wird in der Diskussion kurz eingegangen.)

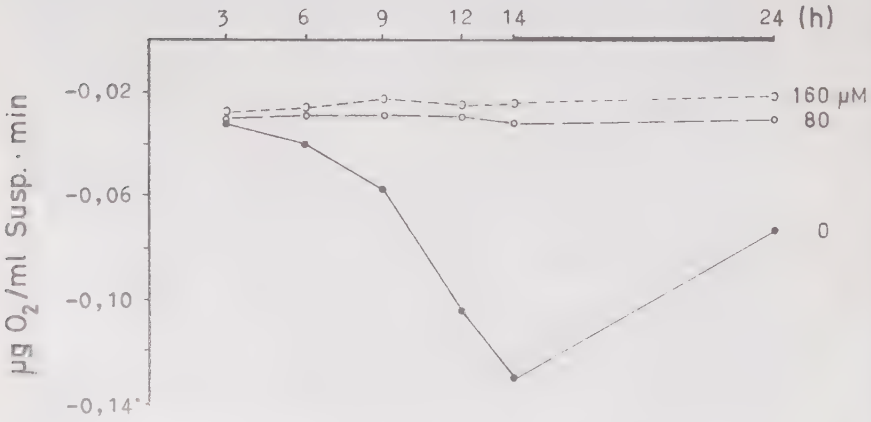


Abb.15

Verlauf der Dunkelatmung (siehe Bedingungen im Text) während eines LDW in Kulturen ohne und mit 80 und 160 µM Diazepam in der Nährlösung (rel.ZZ. = 200).

Eine damit zu berechnende Brutto-Photosynthese ergäbe ein günstigeres aber immer noch deutlich erhöhtes Chlorophyll-Photosynthese-Verhältnis (Abb. 16, vgl. Abb. 14). Wenn man die Möglichkeit anderer Oxydationen im Licht außer Betracht läßt, so müßte unter dem oben genannten Vorbehalt eine Leistungsminderung des Photosyntheseapparates durch Diazepam angenommen werden.

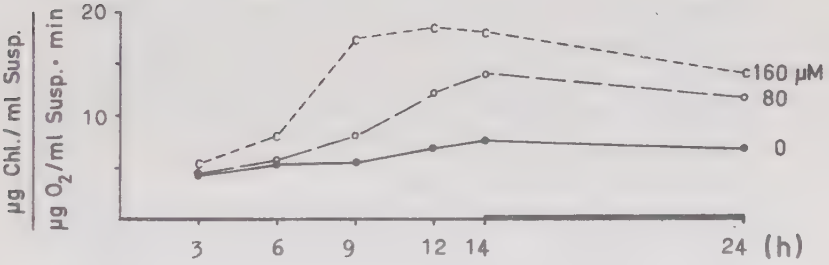


Abb.16
Verhältnis von Chlorophyllgehalt zu einer angenommenen Brutto-Photosynthese (s.Text).

Mit Sicherheit kann allerdings gesagt werden, daß die Rate der Dunkelatmung bei den mit 80 und 160 µM Diazepam vergifteten Scenedesmen im Verlauf des LDW nicht gesteigert wird: Sie bleibt etwa auf dem Anfangsniveau (Ende der 3. Lichtstunde), während die Kontrollrate auf den 4,1fachen Wert nach 14 Lichtstunden steigt.

- Einfluß von ATP in der Nährlösung

Synchronkulturen von Scenedesmus mit relativer Zellzahl = 100 zu Beginn des LDW wurden mit 10^{-4} M Diazepam sowie verschiedenen ATP-Konzentrationen und pH-Werten angezogen. Zwischen 10^{-5} und 10^{-3} M ATP, sowie zwischen pH = 4,0 und 6,0 ist eine Wirkung auf Teilungsrate und lichtmikroskopische Struktur der Zellen nach einem LDW nur bei 10^{-3} M ATP und pH = 4,0 bis 4,3 feststellbar: Es teilen sich einige, manchmal auch viele Zellen; sie setzen auch bisweilen einige Autosporen frei, sehen im Gegensatz zu den ATP-freien Kontrollen kräftig grün aus und haben weniger Vakuolen (Abb. 2e und f). Außerdem haben sie einen signifikant höheren Stickstoffgehalt. Im Verlauf des LDW steigt das pH bei den gegebenen Bedingungen von ~4,3 auf 5,0 bis 5,3 an. Tabelle 2 faßt die gemessenen Werte zusammen.

Senkt man das pH mit H_3PO_4 auf 4,0 in Abwesenheit von ATP, so lassen sich keine Wirkungen gegenüber entsprechenden Kontrollen (d.h. hier mit 10^{-4} M Diazepam) bei pH = 6,0 feststellen.

Messung von	Werte nach einem LDW		
	Kontrolle (100 µM Diazepam)	1 mM ATP plus 100 µM Diazepam	% gegenüber Kontrolle
Gesamtstickstoff (µg/ml Susp.)	5,10	9,92[x)]	194
rel.ZZ.	99,1	159,8	161
davon Autosporen bzw. geteilte Zellen	0	74,3	∞
	0	34,0[x)]	∞

Tabelle 2

Wirkungen von 1 mM ATP auf diazepam-vergiftete Synchronkulturen von Scenedesmus (rel.ZZ. = 100; pH der ATP-Kultur 4,2; pH der Kontrollen 5,8). Die mit x) markierten Werte sind gegenüber den Kontrollwerten mit p = 0,0055 (Stickstoff) bzw. p = 0,004 signifikant.

(c) Beeinflussung der Ionenaufnahme

JYUNG et al. (1965) fanden, daß sie die DNP-bedingte Aufnahmenemmung für Rubidium-Ionen durch isolierte Tabakzellen mit exogenem ATP beseitigen konnten. Die Tatsache, daß ATP im Nährmedium das Wachstum diazepam-vergifteter Scenedesmus-Kulturen signifikant steigern kann (Tab. 2), ließ es möglich erscheinen, daß Diazepam auch den Ionenfluß hemmend beeinflußt, was eventuell durch exogenes ATP teilweise kompensiert wird.

So sollte auch hier geprüft werden, ob Diazepam bzw. ATP einen Einfluß auf die Rubidium-Nettoaufnahme[1] durch Scenedesmus-Zellen haben. Die Nährlösung wurde zu diesen Versuchen nicht verändert, um die Bedingungen gegenüber vorhergehenden Experimenten nicht zu wechseln. Insbesondere wurde Kalium nicht aus dem Medium entfernt, obwohl es die Rb-Aufnahme stark hemmt (EPSTEIN und HAGEN, 1952; FRIED und NOGGLE, 1958; BANGE und OVERSTREET, 1960), wie Abbildung 17 für Scenedesmus bestätigt. Auch wurde kein radioinaktives Rb als Träger zugesetzt, weil physiologische Effekte von höheren Rb-Konzentrationen in Zusammenhang mit Diazepam zuvor nicht untersucht wurden.

Die Experimente zeigen, daß diazepam-vergiftete Zellen mit und ohne exogenem ATP schon nach einer halben Stunde Inkubationszeit und während der ganzen Lichtzeit in jedem Fall weniger Rb aufgenommen hatten als die Kontrollen (Abb. 18a). Die mit ATP angezogene Kultur enthielt sogar während der ersten fünf Kulturstunden wesentlich weniger Radioaktivität als die Diazepam-Kultur. Erst zum Ende der Lichtzeit konvergieren die Werte der verschiedenen Proben; die Diazepam-Kultur bleibt sogar um einige Prozent hinter der ATP-Kultur zurück.

In einem weiteren Versuch wurden Kontrollen und Diazepam-Kulturen verwendet, die denselben pH-Wert wie die ATP-Kulturen hatten. Außerdem wurden Orthophosphat, Na^+ und Adenosin in den dem ATP entsprechenden Mengen zugesetzt ("hydrolysiertes ATP"); dabei stellte sich das pH bereits auf den Wert der ATP-Kulturen ($\sim$ 4,1)

---

[1] Nettoaufnahme = Gesamtaufnahme minus gleichzeitigem (nicht gemessenem) Ausstrom.

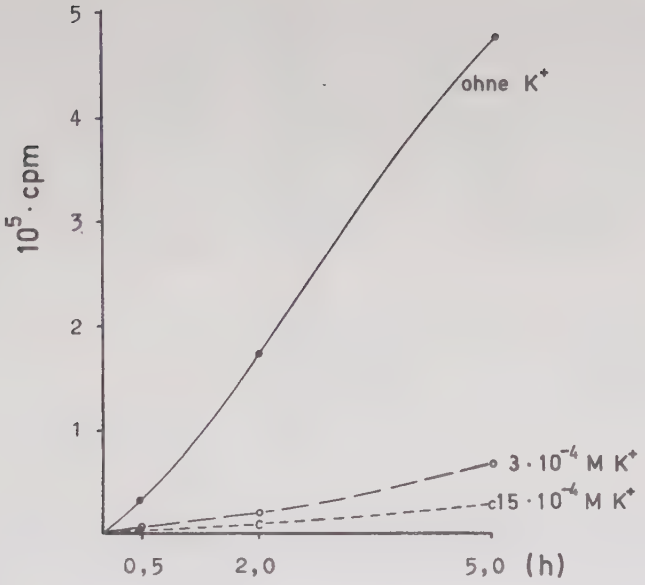


Abb.17

Einfluß von K^+ auf die Aufnahme von Rb-86 durch synchrone Scenedesmuszellen in den ersten 5 h des LDW (rel.ZZ. = 300; 0,1 µCi/ml Nährlösung). Ordinate: gemessene Radioaktivität aus den veraschten Zellen von 10 ml-Proben. Die K^+-Konzentration von normaler Nährlösung beträgt 10^{-2} M. Die jeweils bis zu dieser Konzentration hier fehlenden K^+-Ionen wurden zu Beginn des Versuchs durch Na^+ ersetzt.

ein. Die Abbildung 19a zeigt die Ergebnisse: Da hier die ATP-Kulturen denen der Abbildung 18a entsprechen, hat die von ihnen aufgenommene Radioaktivität auch nahezu den gleichen Verlauf wie dort. Gegenüber dem in Abbildung 18a dargestellten Versuch haben hier die Kontrollen und in den ersten 5 Lichtstunden auch die

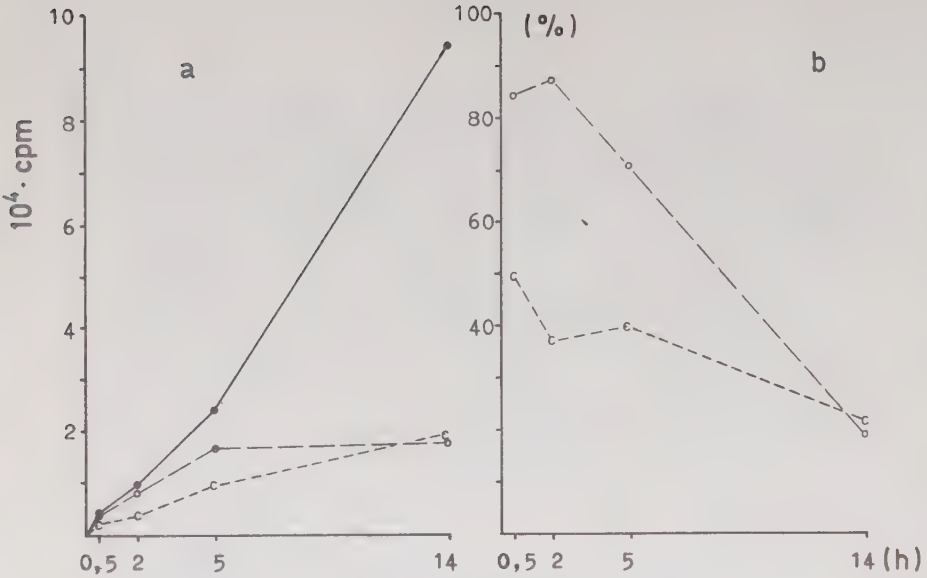
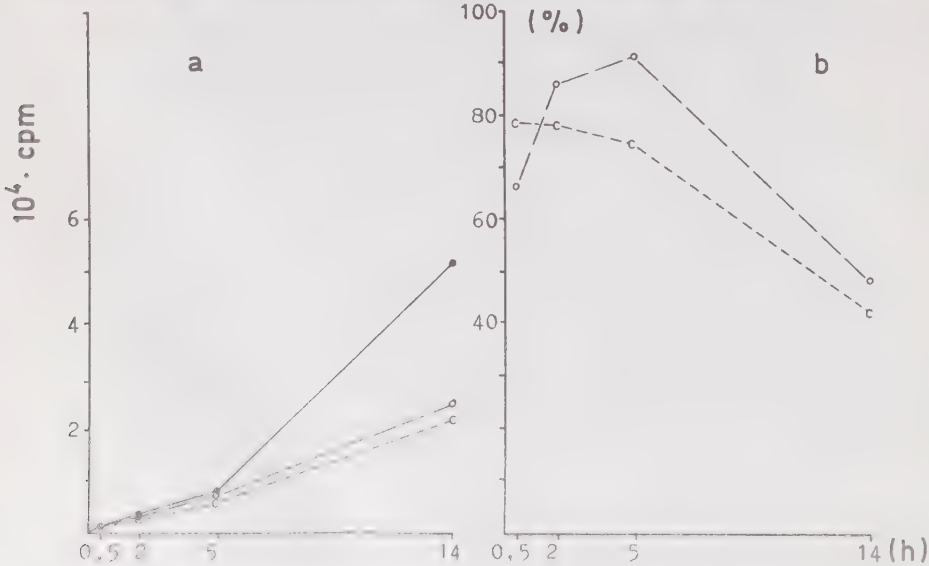


Abb.18: Absolute (a) und relative (b) Rb-86-Nettoaufnahme durch synchrone Scenedesmus-Zellen in der Lichtzeit (rel.ZZ. = 100; 1 µCi/ml Nährlösung, Ordinate: Radioaktivität von 10 ml-Proben). Kontrollen (•——•, bzw.100 % in Abb.18b), 10^{-4} M Diazepam (o——o) und 10^{-4} M Diazepam plus 10^{-3} M ATP (o- - - -c).

Abb.19a und b: Wie Abb.18a und b, jedoch 10^{-3} M "hydrolysiertes ATP" (s.Text) in Kontrollen und Diazepam-Kultur.



Diazepam-Kulturen relativ weniger Rubidium aufgenommen. Auffällig ist der in Abbildung 19a (und 19b) mehr parallele Verlauf der Rb-Aufnahme von Diazepam- und ATP-kultur; eine deutliche Ausnahme von dieser Parallelität machen jedoch die Relativ-Verhältnisse nach der ersten halben Stunde in der Abbildung 19b. Der nach 14 Stunden höhere Rb-Gehalt der Diazepam-Kultur in Abbildung 19a gegenüber derjenigen in Abbildung 18a ist ebenfalls überraschend.

Man kann vereinfachend zusammenfassen, daß die Verlaufscharakteristiken in den Abbildungen 18a und 19a ähnlich sind. Die Rb-Aufnahmeraten in Abbildung 19a sind jedoch - mit Einschränkungen - geringer und mehr parallel. In allen Fällen haben die Kulturen mit Diazepam bzw. mit Diazepam plus ATP weniger Rubidium aufgenommen als die Kontrollen. Und schließlich nehmen ATP-Kulturen meistens weniger Rubidium auf als Diazepam-Kulturen.

(d) Wirkungen auf die Ultrastruktur

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen an vergifteten Scenedesmus-Zellen aus Synchronkulturen mit relativer Ausgangs-Zellzahl = 100 wurden am Ende der 14. und 24. Stunde des LDW vorgenommen. Dabei kann man die Kontrollen nach der 24. Stunde als Entsprechung des Ausgangsmaterials (bei Beginn des LDW) ansehen.

Vom Beginn des LDW an mit 0, 40, 80 und 160 µM Diazepam vergiftete Zellen wurden nach Anwendung verschiedener chemischer Fixationsverfahren mikroskopiert. Es zeigte sich, daß nur wenige Verfahren befriedigende Kontrastverhältnisse in den Ultradünnschnitten ergaben; außerdem erbrachte eine jeweils verwendete Fixationsmethode bei den verschiedenen Entwicklungsstadien der Zellen (besonders bei Teilungsstadien) und bei unterschiedlichem Grad der Diazepam-Vergiftung ungleiche Kontrastergebnisse in den elektronenmikroskopischen Präparaten.

Als insgesamt ungeeignet schieden folgende fünf Fixierungsverfahren wegen verwaschener Strukturen oder zu schwachem Kontrast aus: 1.) Chrom-Osmiumsäure-Fixierung nach DALTON (1955) (manchmal bedingt geeignet), 2.) dieselbe Methode mit nachfolgender einstündiger Fixation mit 0,5 % $KMnO_4$ bei ca. 20° C, 3.) eine Glutaraldehyd-Fixierung (1 % in 0,1 M Phosphat-Puffer bei pH = 7,2; 1 h, ca. 20° C) gefolgt von Chrom-Osmiumsäure (1 % OsO_4, 1,1 % $K_2Cr_2O_7$; 1 h, ca. 20° C) und anschließender Permanganat-Fixierung wie bei der 2. Methode (vgl. SCHNEPF et al., 1971), 4.) die OsO_4-Fixierung nach PALADE (1952) mit Veronal-Acetat-Puffer und 5.) eine Glutaraldehyd-Fixierung (1 % in 0,1 M Phosphat-Puffer pH = 7,2; 1 h, 0° C) mit anschließender OsO_4-Fixierung (1 %, 0,1 M Phosphat-Puffer pH = 7,2; 1 h, 20° C).

Befriedigender bis guter Kontrast konnte dagegen nur mit den beiden in Abschnitt C 3 c (Seite 14) beschriebenen Methoden erzielt werden. Davon ergab die Nachfixierung mit OsO_4 plus Dichromat zwar die bessere Auflösung der Feinstruktur, hatte aber in vielen Fällen zu schwachen Kontrast. Aus diesen Gründen wurde meist der

stärkere aber grobere Kontrast durch eine $KMnO_4$-Nachfixierung vorgezogen.

Alle im folgenden Teil dieses Abschnittes angegebenen Mittelwerte stammen aus mindestens 10 bis 20 Einzelmessungen. Statistische Sicherungen konnten nicht errechnet werden, weil die verwendeten Mikrofotografien keine Zufallsauswahl sondern eine Auswahl gut kontrastierter Zellen darstellen.

Bei den Untersuchungen der Feinstruktur werden eine Reihe morphologischer Abweichungen der vergifteten Zellen von den Kontrollen erkennbar: Von den Veränderungen sind vor allem Chloroplasten, Mitochondrien und Vakuolen betroffen. Außerdem unterbleibt bei 80 und 160 µM Diazepam mehr oder weniger eine Teilung und Vermehrung der Zellkerne. Parallel dazu werden (mit wenigen Ausnahmen bei 80 µM) keine Tochterzellwände mehr gebildet.

In den Zellen der Kontrollen sind am Ende der Lichtzeit die Chloroplasten, die sehr viele Stärkeablagerungen enthalten, gewöhnlich auch dann schon geteilt, wenn keine Tochterzellwände vorhanden sind (Abb. 20a und 21). Jeweils mehrere Thylakoide sind zu kurzen oder längeren Stapeln gepackt. Die Mitochondrien sind klein und je nach Orientierung im Schnitt rundlich oder länglich mit Durchmessern von ca. 0,3 bis 0,5 µm. Vakuolen sind häufig aber mit durchschnittlich 0,5 µm Durchmesser sehr klein.

Die Strukturen der mit 40 µM Diazepam vergifteten Zellen entsprechen noch ziemlich genau denen der Kontrollen. Es wird allenfalls manchmal eine Umorientierung (gemessen an der Ausrichtung der Starkeablagerungen parallel zur Zellwand) beobachtet (vgl. Abb. 20b mit Abb. 20a).

Große Unterschiede dagegen liegen in den mit 80 und 160 µM Diazepam vergifteten Zellen vor: Wie schon aus

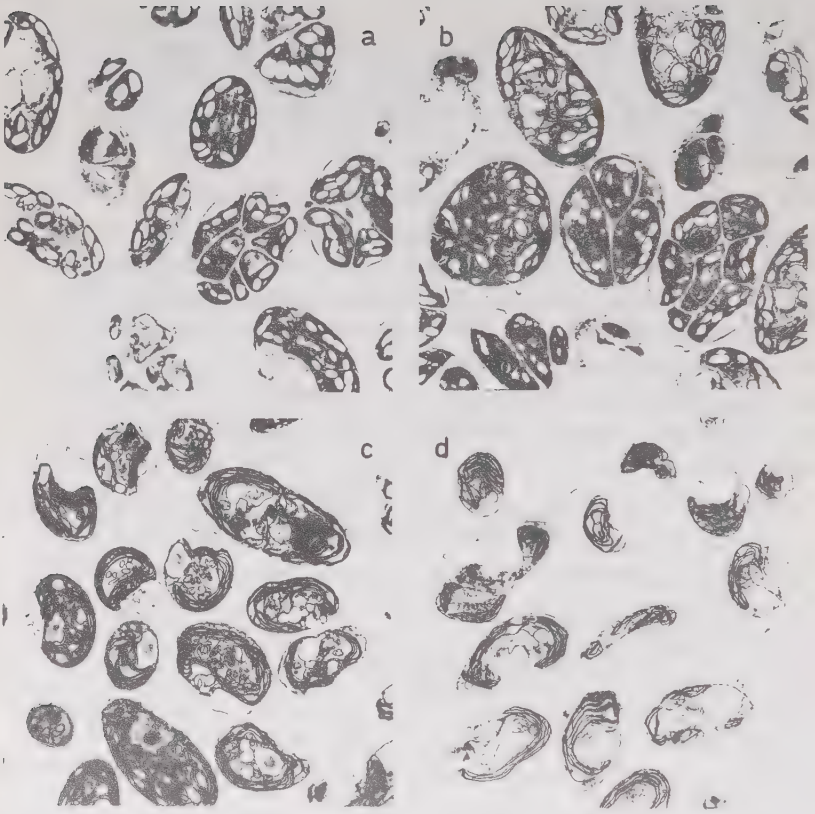


Abb.20

Scenedesmus-Zellen am Ende der Lichtzeit des LDW. Übersichten: (a) Kontrollen, (b) 40 µM, (c) 80 µM, (d) 160 µM Diazepam.
GA/Mn/Pb 2800 x

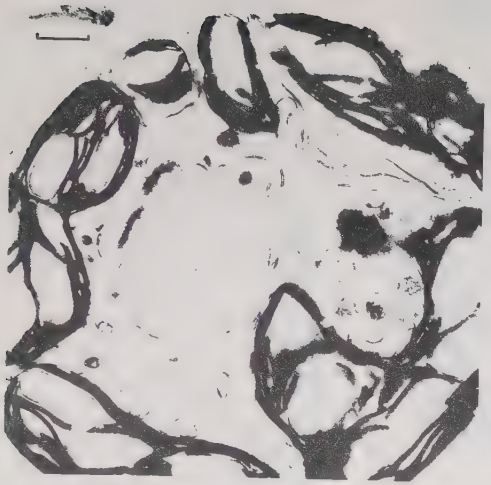


Abb.21
Ende der Lichtzeit, Kontrolle,
GA/Mn/Pb 10ooo x

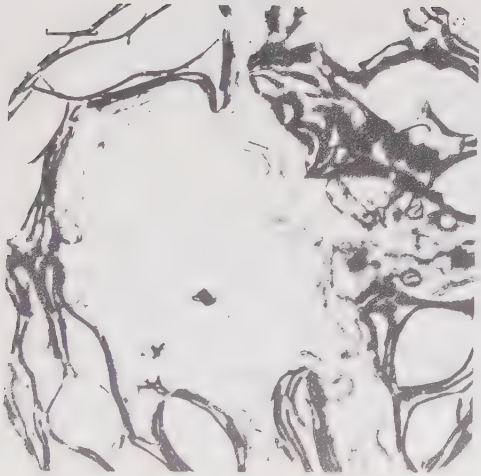


Abb.22
Ende der Lichtzeit, 40 µM Diazepam,
GA/Mn/Pb 10ooo x

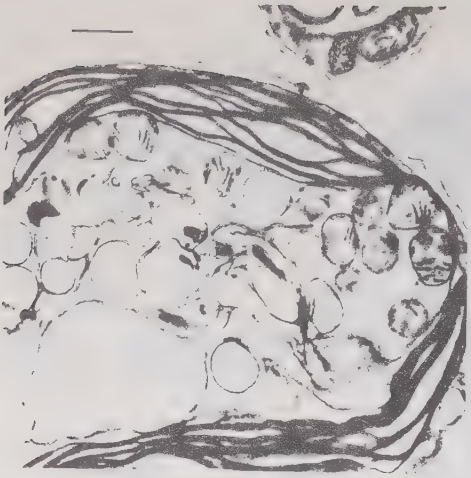


Abb.23
Ende der Lichtzeit, 80 µM Diazepam,
GA/Mn/Pb 12ooo x

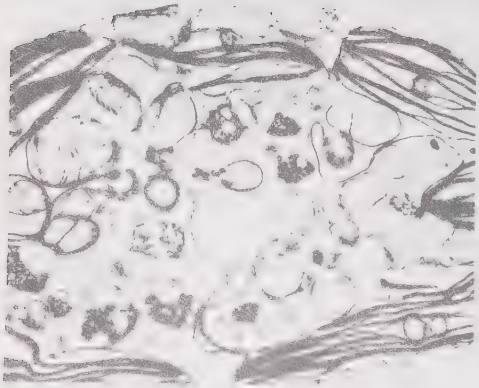


Abb.24
Ende der Lichtzeit, 80 µM Diazepam,
GA/Mn/Pb 10ooo x

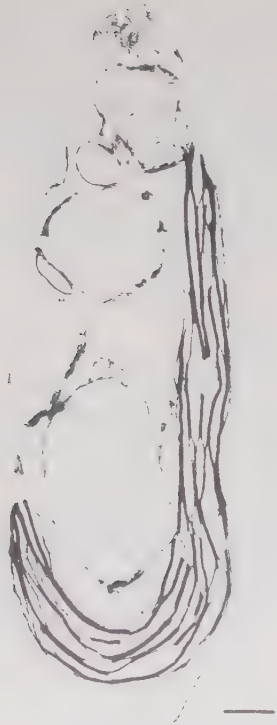


Abb.25
Ende der Lichtzeit,
160 uM Diazepam,
GA/Mn/Pb 10ooo x

den Übersichtsaufnahmen in den Abbildungen 20c und 20d hervorgeht, besitzen nur noch die 80 µM-Proben in einigen Dünnschnitten der Zellen wenige Stärkeeinschlüsse, während die extrem vergifteten Scenedesmen (160 µM) davon frei sind. Die Chloroplasten scheinen meistens ungeteilt; ihre Thylakoide sind zwar noch streckenweise

dicht gepackt, aber oft zweigen einzelne Thylakoide von den langen Stapeln aus wenigen Thylakoiden ab, um in benachbarte Stapel einzumünden (Abb. 23). Plastoglobuli wurden nach Fixierung mit Permanganat nicht beobachtet. In den wegen des mangelhaften Kontrastes hier nicht wiedergegebenen Abbildungen von OsO_4-$K_2Cr_2O_7$-nachfixierten Zellen wurden sie allerdings wie bei den asynchronen mit Diazepam gewachsenen Scenedesmen regelmäßig und zahlreich gesehen (vgl. Abb. 35).

Die Mitochondrien der stärker vergifteten Zellen kommen fast nur in mehr oder weniger abgerundeter Form vor, sind deutlich größer und enthalten viele Cristae (Abb. 23 und 25). Die jeweiligen Flächenausdehnungen der Mitochondrien im Schnitt[1)] sind bei 80 µM Diazepam im Mittel etwa doppelt so groß wie bei den Kontrollen (Tabelle 3). Bei diesen beträgt auch der größere Durchmesser der mehr längs getroffenen Mitochondrien zwischen 0,5 und 1 µm, während bei Vergiftung mit 160 µM Diazepam rundliche Formen mit z.T. über 2 µm Durchmesser (bei 80 µM Diazepam meist um 1 µm) vorkommen.

Auch die Vakuolen der stärker vergifteten Zellen sind größer - bei mittleren Durchmessern von 0,85 µm (80 µM) und 2,0 µm (160 µM Diazepam). Wie schon die Übersichts-Abbildungen 20c und 20d zeigen, erscheinen oft große extraplasmatische Räume zwischen Zellwand und Plasma (bzw. Plasmalemma, wenn es erhalten blieb). Diese Räume werden als Fixierungs- oder Einbettungsartefakte gedeutet, die vielleicht durch Herausquetschen von Vakuolen beim Zentrifugieren entstehen. Solche

---

1) Mitochondrien weichen im Dünnschnitt oft stark von der Kreisform ab. So wurden allgemein keine Durchmesser sondern die Flächen der Mitochondrien im Schnitt planimetrisch gemessen.

Diazepam-Konzentration (µM)	Mitochondrien		Vakuolen	
	nach der 14. h (μm^2)	nach der 24. h (μm^2)	nach der 14. h (µm)	nach der 24. h (µm)
0	0,26	0,26	0,5	0,9
40	0,29	0,44	0,6	1,1
80	0,52	0,45	0,9	3,4
160	1,14	0,97	2,0	3,4

Tabelle 3

Mittlere Flächenausdehnungen der Mitochondrien und mittlere Vakuolendurchmesser von Scenedesmus in den Ultradünnschnitten der am Ende der 14. und 24. Stunde des LDW fixierten Zellen.

Räume wurden jedenfalls bei lebenden Zellen im Lichtmikroskop nicht beobachtet. Dagegen sind die großen Vakuolen lichtoptisch deutlich zu sehen (Abb. 2d und 2e). Mancnmal enthalten die Vakuolen elektronenoptisch sehr dichtes körniges, vernetztes oder sehr kompaktes Material (Abb. 24).

Tochterzellwände sind bei stark vergifteten Zellen am Ende der Lichtzeit des LDW noch nicht zu erkennen, wenn auch - besonders bei 80 µM Diazepam - hin und wieder eine beginnende Teilung durch Membranen besonders zwischen den Tochterkernen gesehen wurde, von

denen (bei 80 µM) manchmal bis zu fünf in einem Schnitt zu sehen waren; dagegen hatten die mit 160 µM Diazepam inkubierten Zellen niemals mehr als einen Kern im jeweiligen Schnitt.

Am Ende des LDW haben Kontrollen und die mit 40 µM Diazepam vergifteten Kulturen ihre Tochterzellen freigesetzt - wie lichtoptisch schon gezeigt wurde (Abb. 26a und 26b; vgl. Abb. 2a und 2b). Diese enthalten noch einige Stärkeeinschlüsse in ihren Plastiden, deren Thylakoide bei den Kontrollen meist wieder zu längeren lamellenartigen Stapeln gepackt zusammenliegen (Abb. 27), bei den mit 40 µM Diazepam vergifteten Zellen aber in meist kürzeren, wie abgehackt erscheinenden Stapeln vorliegen (Abb. 28) und sich - wie in Abbildung 26b erkennbar - in einigen Zellen stärker krümmen und zu turbulenten Anordnungen formieren können.

Bei den stärker vergifteten Zellen (Abb. 29 und 30) konnte gegenüber dem Ende der Lichtzeit keine qualitativ veränderte Anordnung der Thylakoide gefunden werden. Dies gilt auch für die Plastoglobuli. Stärkeeinschlüsse wurden nur noch in Spuren beobachtet. Soweit es ohne statistische Auswertung bzw. ohne Anfertigung von Schnittserien erkennbar ist, sind die Chloroplasten auch nicht stärker geteilt als am Ende der Lichtzeit des LDW.

Die Flächenausdehnungen der Mitochondrien haben in allen Proben etwa dieselben durchschnittlichen Absolut- und Relativwerte wie am Ende der Lichtzeit. Nur die 40 µM-Diazepam-Proben haben am Ende des LDW größere Mitochondrien als am Ende der Lichtzeit (Tabelle 3). Auch sonst gleichen sie in Form und Inhalt etwa jenen vom Ende der Lichtzeit. Allerdings sieht man bei den Kontrollen mehr Cristae am Ende als am Beginn der

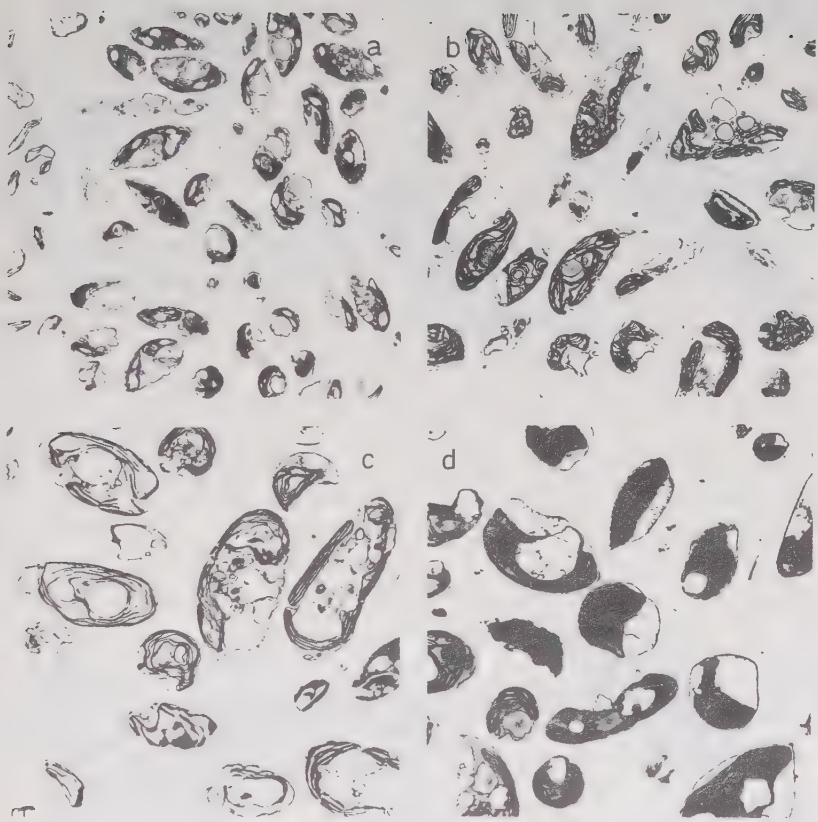


Abb.26

Scenedesmus-Zellen am Ende des LDW. Übersichten: (a) Kontrollen; diese können als Entsprechung des Ausgangsmaterials von allen Proben der Synchronkulturen am Beginn des LDW angesehen werden; (b) 40 µM, (c) 80 µM, (d) 160 µM Diazepam. GA/Os+Cr/Pb für (a) und GA/Mn/Pb für (b) bis (d); 2800 x

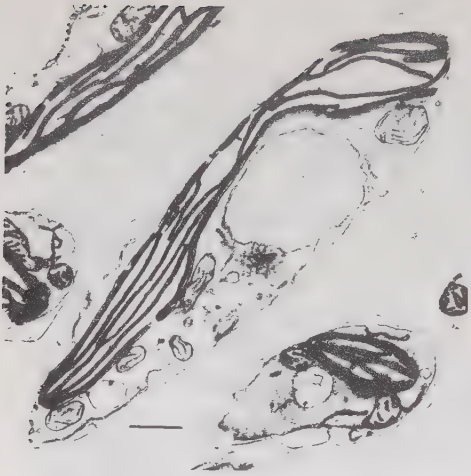


Abb.27
Ende des LDW (Zugleich Beginn eines neuen LDW, vgl.Abb.26a), Kontrollen,
GA/Mn/Pb 10ooo x

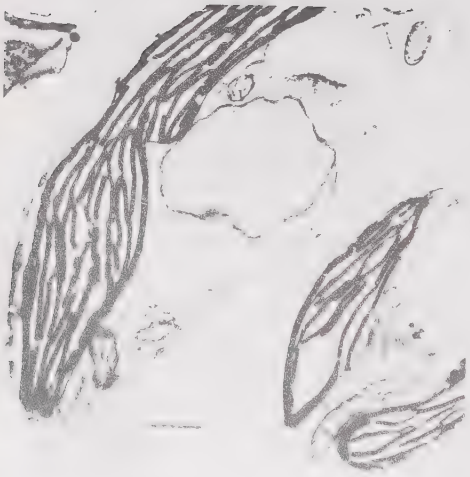


Abb.28
Ende des LDW,
40 µM Diazepam,
GA/Mn/Pb 10ooo x

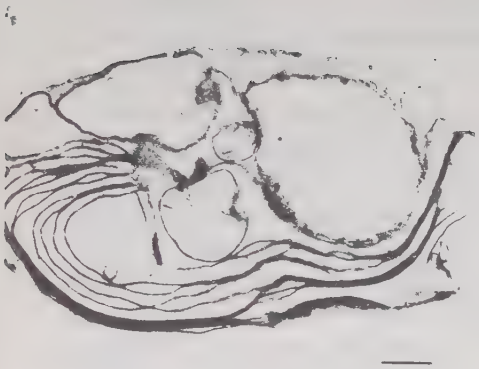


Abb.29
Ende des LDW,
80 µM Diazepam,
GA/Mn/Pb 10ooo x

Abb.30
Ende des LDW,
160 µM Diazepam,
GA/Mn/Pb 10ooo x

Dunkelzeit, was aber möglicherweise mit der besseren Kontrastierbarkeit der Membranen am Ende der Dunkelzeit bei den unvergifteten Zellen erklärbar ist (Abb. 27).

Die Vakuolen aller Proben haben zum Ende des LDW einen größeren mittleren Durchmesser als am Ende der Lichtzeit - mit Schwankungen zwischen 0,3 und 2 µm bei 0 und 40 µM Diazepam, sowie 2 und 5 µm bei 80 und 160 µM. Tabelle 3 faßt die Mittelwerte nochmal zusammen. Die wahrscheinlich artefiziellen "extraplasmatischen Räume" treten ebenfalls wieder häufig bei den stärker vergifteten Zellen auf. Diese bilden bis zum Ende des LDW auch allgemein keine Tochterzellwände aus, doch gibt es Ausnahmen bei 80 µM Diazepam-Kulturen, in denen ab und zu Tochterzellen und voneinander getrennte Autosporen vorkommen. In den ungeteilten Zellen sieht man gewöhnlich nicht mehr als einen Kern, ganz selten jedoch mehrere, bis zu vier Kerne.

(2) Wirkungen von Diazepam auf photoautotrophe und heterotrophe asynchrone Kulturen von Scenedesmus obliquus

Nachdem Diazepam in der Dunkelphase des LDW von synchronisierten Scenedesmen nur einen sehr schwachen Effekt zeigte (vgl. Tab. 1), konnte man vermuten, daß anabolische Stoffwechselprozesse - besonders mit der Photosynthese zusammenhängende Reaktionen - ein Hauptwirkungsbereich des Pharmakons bei Scenedesmus sein könnten.

Deshalb wurden auch Versuche mit Scenedesmus im Dunkeln, also ohne Photosynthese durchgeführt: Dem Nährmedium asynchroner, heterotropher Kulturen wurden (neben 1 % Glucose) kein, 80 und 160 µM Diazepam zugesetzt. Diese Proben wurden alle mit photoautotrophen Zellen verglichen. Photoautotrophe und heterotrophe Kulturen wurden von derselben autotrophen Elternkultur verdünnt; die heterotrophen Kulturen wurden vor Beginn des Versuchs nicht an Glucoseernährung adaptiert. Alle Proben wurden nach zwei Tagen elektronenmikroskopisch untersucht und von allen der Verlauf des Chlorophyllgehalts über 5 Tage bestimmt. Dieser Verlauf ist in Abbildung 31a und b dargestellt und gibt an, daß unter Bedingungen, unter denen die Photosynthese keine Rolle spielt, Diazepam die Chlorophyllsynthese hemmt.

Ob dies direkt oder indirekt geschieht, wurde hier nicht weiter geprüft. So kann z.B. nicht ausgeschlossen werden, daß Diazepam nur die Adaptation an die Glucoseaufnahme verhindert wie z.B. Cycloheximid (TANNER und KANDLER, 1967).

Auffällig bei den autotrophen im Gegensatz zu den heterotrophen 160 µM-Diazepam-Kulturen ist das Absinken des Chlorophyllgehalts bis auf 7,6 % des Ausgangswertes.

Auch scheinen sich die Mengenverhältnisse der Pigmente

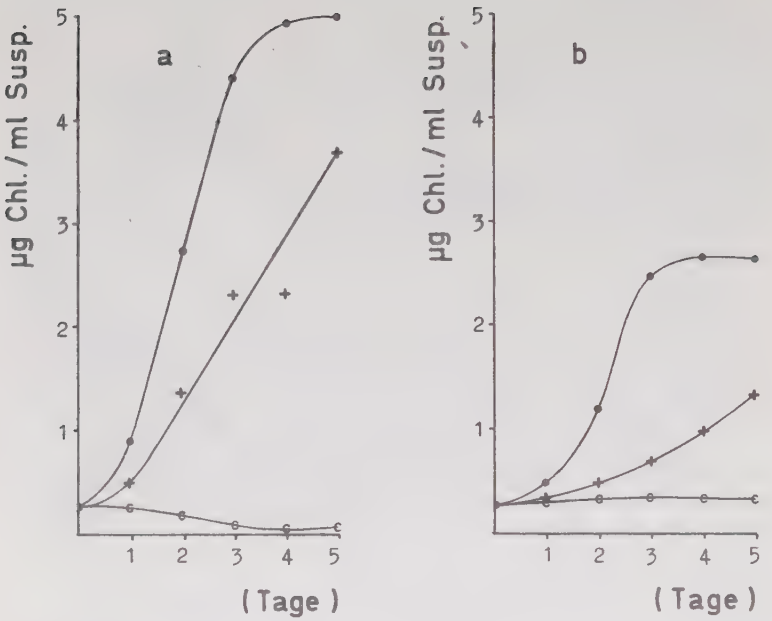


Abb.31

Zunahme des Chlorophyllgehalts in asynchronen Scenedesmus-Kulturen: (a) photoautotroph, (b) heterotroph (1 % Glucose, Dauerdunkel) - bei Versuchsbeginn ohne vorherige Adaptation aus derselben autotrophen Elternkultur wie (a) verdünnt.
Kontrollen (•——•); 80 µM Diazepam (+——+); 160 µM D. (o——o).

zu verändern: Abbildung 32 zeigt die Pigment-Absorptions-Spektren von Methanolextrakten zweier Kulturen, die zwei Tage lang ohne bzw. mit 160 µM Diazepam in der Nährlösung gewachsen waren. Diese relativen Veränderungen der Spektren wurden bei vergifteten Kulturen häufiger festgestellt, aber nicht im einzelnen ver-

folgt. Es handelt sich im wesentlichen um eine Absorptionsdifferenz zwischen vergifteten Proben und Kontrollen bei 470 nm und in geringerem Umfang bei kürzeren Wellenlängen. Um dies zu messen, wurden die Pigmentextrakte zuvor auf gleiche Absorption bei 665 nm eingestellt. Die Absorptionsdifferenzen im Blaubereich werden wieder als ein erhöhtes Carotinoid/Chlorophyll-Verhältnis und nicht als eine Veränderung im Chlorophyll b/Chlorophyll a-Verhältnis gedeutet, weil keine Unterschiede der Spektren bei 650 nm (Absorptions-Maximum von Chlorophyll b) beobachtet werden konnten.

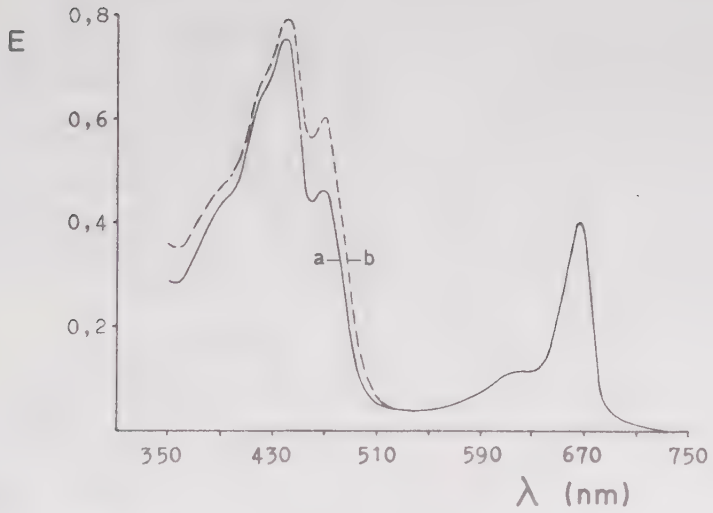


Abb.32

3 Tage im Dauerdunkel, dann 2 Tage ohne Verdünnung im Dauerlicht gewachsene asynchrone Kultur von Scenedesmus: Absorptionsspektren der Methanolextrakte: (a) ohne Diazepam, (b) mit 160 µM Diazepam über alle 5 Tage.

Elektronenmikroskopisch ähneln die autotrophen asynchronen Kulturen mit 80 und 160 µM Diazepam nach zwei Tagen Anzuchtdauer den stärker vergifteten Synchronkulturen am Ende der 14. und 24. Stunde des LDW (Abschnitt D 1 d): Bei extremer Vergiftung findet man keine Stärke mehr in den Plastiden, die Mitochondrien und Vakuolen sind größer, es treten "extraplasmatische Räume" auf und es sind keine Teilungsstadien zu sehen (außer einigen Ausnahmen bei 80 µM Diazepam) (Abb. 33b, 33c, 34 und 35). Zusätzlich findet man nach der hier ausschließlich angewendeten Chrom-Osmiumsäure-Nachfixierung auch Plastoglobuli (Abb. 35). Der relativ schwache Kontrast (vgl. Abschnitt D 1 d) bei den heterotroph gewachsenen Zellen verhindert leider noch eine intensivere Untersuchung. Immerhin ist jedoch in den Abbildungen 36b, 36c, 37 und 38 deutlich der hohe Stärkegehalt der vergifteten Zellen zu erkennen, die - im weiteren Gegensatz zu den autotrophen Zellen - keine Plastoglobuli, keine großen Vakuolen und "extraplasmatischen Räume" und, soweit nachweisbar, keine sehr großen Mitochondrien enthalten. Wie den autotrophen fehlen auch den heterotrophen diazepam-vergifteten Zellen die Teilungsstadien.

Abb.33

Photoautotrophe asynchrone Dauerlicht-Kulturen von Scenedesmus, 2 Tage ohne Verdünnung gewachsen.

(a) Kontrollen,
(b) 80 µM Diazepam,
(c) 160 µM Diazepam.

GA/Os+Cr/Pb 2800 x

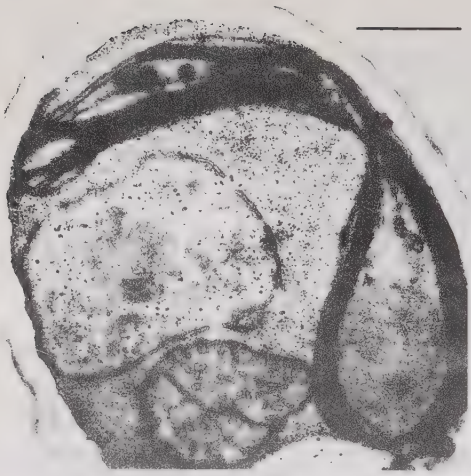


Abb.34
wie Abb.33c
(160 µM Diazepam)
20ooo x

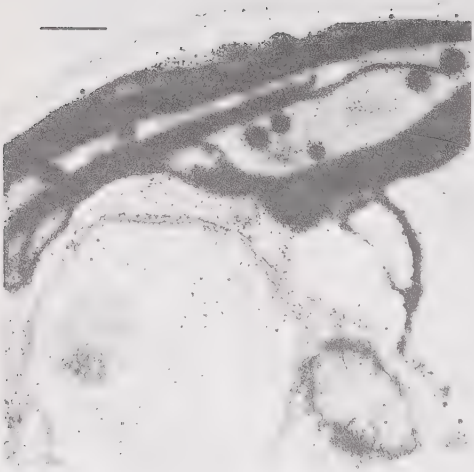


Abb.35
wie Abb.33c
13ooo x

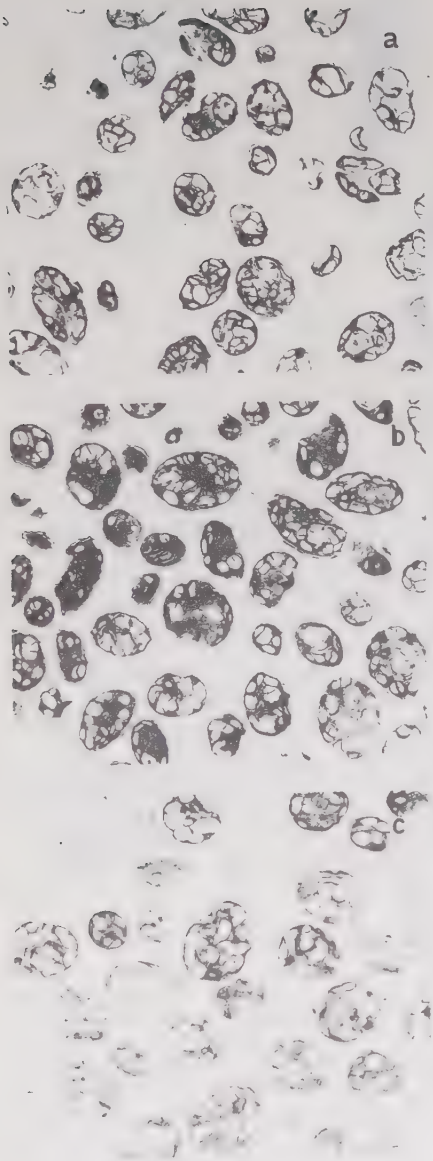


Abb.36

Heterotrophe asynchrone Kulturen von Scenedesmus, 2 Tage ohne Verdünnung im Dauerdunkel mit 1 % Glucose gewachsen.

(a) Kontrollen,
(b) 80 µM Diazepam,
(c) 160 µM Diazepam.

GA/Os+Cr/Pb 2800 x

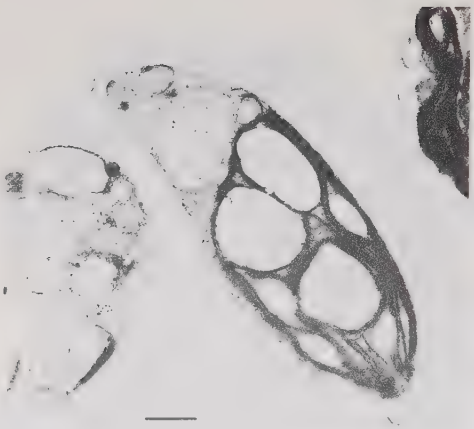


Abb.37
wie Abb.36b
(80 µM Diazepam)
10ooo x

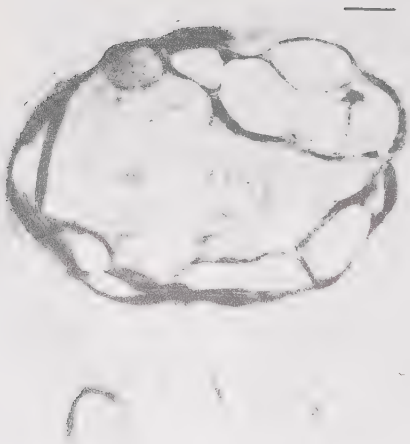


Abb.38
wie Abb.36c
(160 µM Diazepam)
10ooo x

(3) Wirkungen von Diazepam auf andere pflanzliche Organismen

Mit den Versuchen, aus denen die hier beschriebenen Ergebnisse stammen, sollte festgestellt werden, ob die von Diazepam verursachte Wachstumshemmung auf Scenedesmus beschränkt ist, insbesondere ob auch Prokarionten und höhere Pflanzen diazepam-empfindlich sind.

(a) Anacystis nidulans

Asynchrone Dauerlichtkulturen von Anacystis mit relativer Zellzahl = 960 bei Versuchsbeginn wurden über 5 Tage mit verschiedenen Diazepam-Konzentrationen angezogen. Die Ergebnisse der täglichen Messung von organisch gebundenem Stickstoff und relativer Zellzahl sind aus den Abbildungen 39 und 40 ersichtlich. Es zeigte sich, daß die wachstumshemmenden Diazepam-Konzentrationen etwa im gleichen Bereich wie bei Scenedesmus liegen.

Auffällig ist das starke Wachstum in Gegenwart von 80 µM Diazepam. Es setzt zwar später ein als bei den Kontrollen, nimmt aber dann bis zum 5. Tag zu, während Kontrollen und schwächer vergiftete Kulturen schon ab dem 3. bzw. 4. Tag in die stationäre Phase übergehen. In Anwesenheit von 160 µM Diazepam setzt überhaupt kein Wachstum mehr ein. Man beachte die Ähnlichkeit der Verlaufskurven von Gesamtstickstoff und relativer Zellzahl.

(b) Zell-Suspensionskultur von Petroselinum sativum

Von den in vollsynthetischem Nährmedium frei suspendierten Kalluszellen der Petersilie wurde fast 4 Wochen lang der Gesamtstickstoff bestimmt (Abb. 41). Das etwas langsame Wachstum der Kontrollen wird auf den hier sehr niedrig gehaltenen pH-Wert (4,8) zurückgeführt. Zumin-

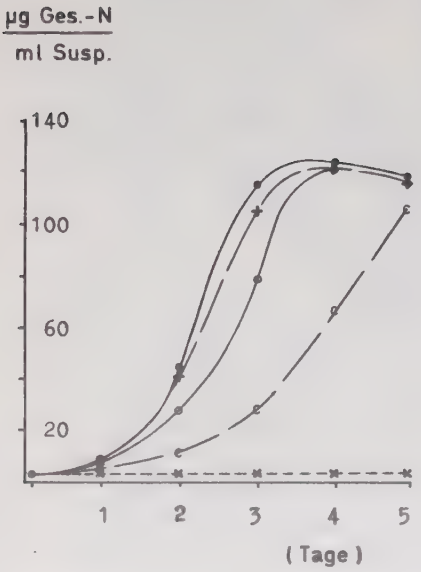


Abb.39

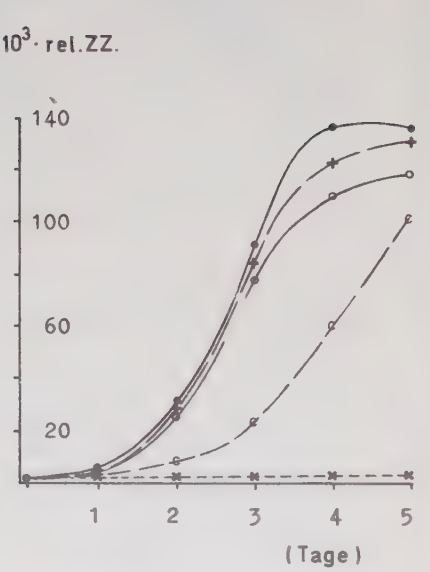


Abb.40

Anacystis nidulans: Wachstum über 5 Tage bei verschiedenen Diazepam-Konzentrationen im Nährmedium (Kontrollen: •——•; 20 µM Diazepam: +——+ ; 40 µM: o——o ; 80 µM: c——c ; 160 µM: ×----×).
Abb.39: Zunahme des organisch gebundenen Stickstoffs,
Abb.40: Zunahme der relativen Zellzahl.

dest unter den gegebenen Bedingungen scheint Petroselinum etwas empfindlicher als Anacystis auf Diazepam zu reagieren (vgl.Abb.39): Im Gegensatz zu Anacystis baute Petroselinum bei 80 µM Diazepam keinen zusätzlichen Stickstoff mehr ein. Ähnlich wie die 80 µM-Kurve bei Anacystis steigt bei der Petersilie die 40 µM-Kurve noch während der stationären Phase der Kontrollen weiter an.

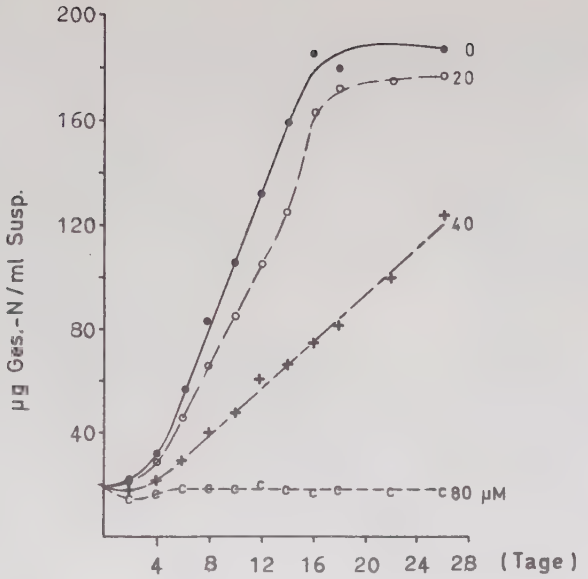


Abb.41

Petroselinum sativum, Zell-Suspensionskultur: Zunahme des organisch gebundenen Stickstoffs (Ges.-N) bei verschiedenen Diazepam-Konzentrationen im vollsynthetischen Nährmedium (s. Anhang 1).

(c) Stehende Wasserkulturen von Pisum sativum

Nach dem Auskeimen und Einhängen der Wurzeln in mineralische Nährlösung wurden von jeweils 20 Erbsenpflanzen ohne und mit 200 bzw. 400 µM Diazepam im Nährmedium bis zum 14. Tag die Längen der Sprosse, Hauptwurzeln und der langsten Seitenwurzeln gemessen. Nach dem äußeren Eindruck schien das Pharmakon keine Wirkung auf das Wachstum der Pflanzen zu haben. Sproß- und Seitenwurzellangen unterschieden sich auch nur minimal voneinander. Nur die Hauptwurzeln waren im Langenwachstum in Diazepamnahrlösung gehemmt (Abb.42). Dabei unterscheiden sich die Mittelwerte der Wurzellängen am 14.

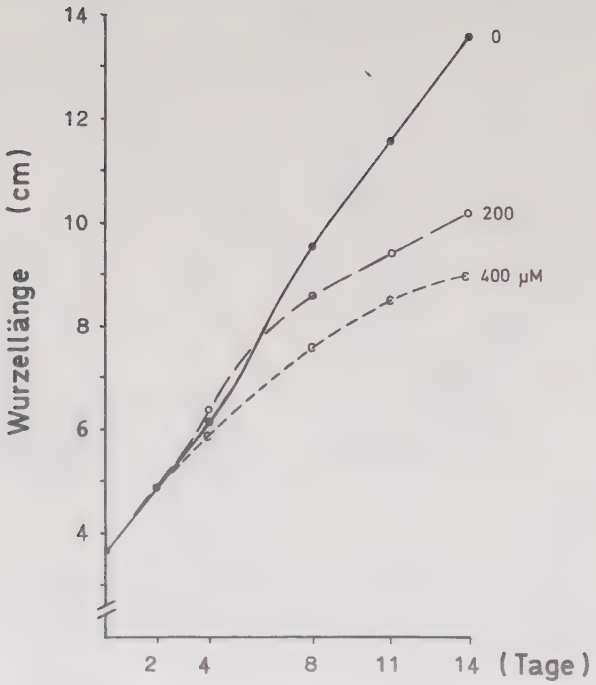


Abb.42

Pisum sativum: Längenwachstum der Hauptwurzel von Erbsenpflanzen nach dem Auskeimen und Einhängen der Wurzel in mineralische Nährsalz-Lösung (s. Anhang 2) ohne und mit 200 sowie 400 µM Diazepam.

Tag alle signifikant voneinander: Die Werte der vergifteten Pflanzen sind mit p = 0,040 noch schwach gegeneinander gesichert; die Werte der Kontrollen sind von denen der vergifteten Pflanzen mit jeweils p < 0,0002 hochsignifikant verschieden.

(4) Wirkung anderer Benzodiazepine auf Scenedesmus (Chlordiazepoxid und Medazepam)

Neben Diazepam wurden noch Chlordiazepoxid (Librium) und Medazepam (Nobrium) in ihrer Wirkung auf die relative Autosporenproduktion (RAP) von Scenedesmus untersucht. Dabei ergaben sich recht große Unterschiede in der Wirksamkeit gleicher molarer Konzentrationen der drei Benzodiazepine.

Während Diazepam nach Abbildung 43 eine mittlere teilungshemmende Wirkung ausübt, ist zur vollständigen Unterdrückung der Autosporenproduktion mit Chlordiazepoxid mehr als die doppelte molare Konzentration wie von Diazepam erforderlich. Besonders auffällig ist eine teilungsstimulierende Wirkung von Chlordiazepoxid von etwa 10 bis 90 µM. Dabei treten zwei Maxima (bei 20 und 50 µM) und ein Minimum (bei 40 µM) auf. Beide Maxima sind mit $p < 0{,}0095$ bzw. $p = 0{,}0008$ gegen den 100 %-Wert der Kontrollen gesichert, das Minimum aber nur noch mit gewissen Zweifeln ($p = 0{,}010$). Dieses Minimum ist gegenüber keinem der beiden Maxima signifikant, obwohl es bei vier von fünf Versuchen dort und beim fünften Versuch bei 30 µM auftauchte! (Siehe Diskussion) Bis 90 µM bleiben die Kulturen auch vollsynchron.

Lichtmikroskopisch weisen die chlordiazepoxid-behandelten Kulturen keine weiteren Unterschiede zu den diazepam-behandelten auf. Das gilt auch für Medazepam.

Medazepam verhindert schon bei mehr als 10mal geringerer Konzentration als Chlordiazepoxid die Autosporenproduktion (und Zellteilung) vollständig (Abb. 43). Mit steigender Medazepam-Konzentration zwischen 7,5 und 15 µM erfolgt ein sehr steiler und gleichmäßiger Abfall

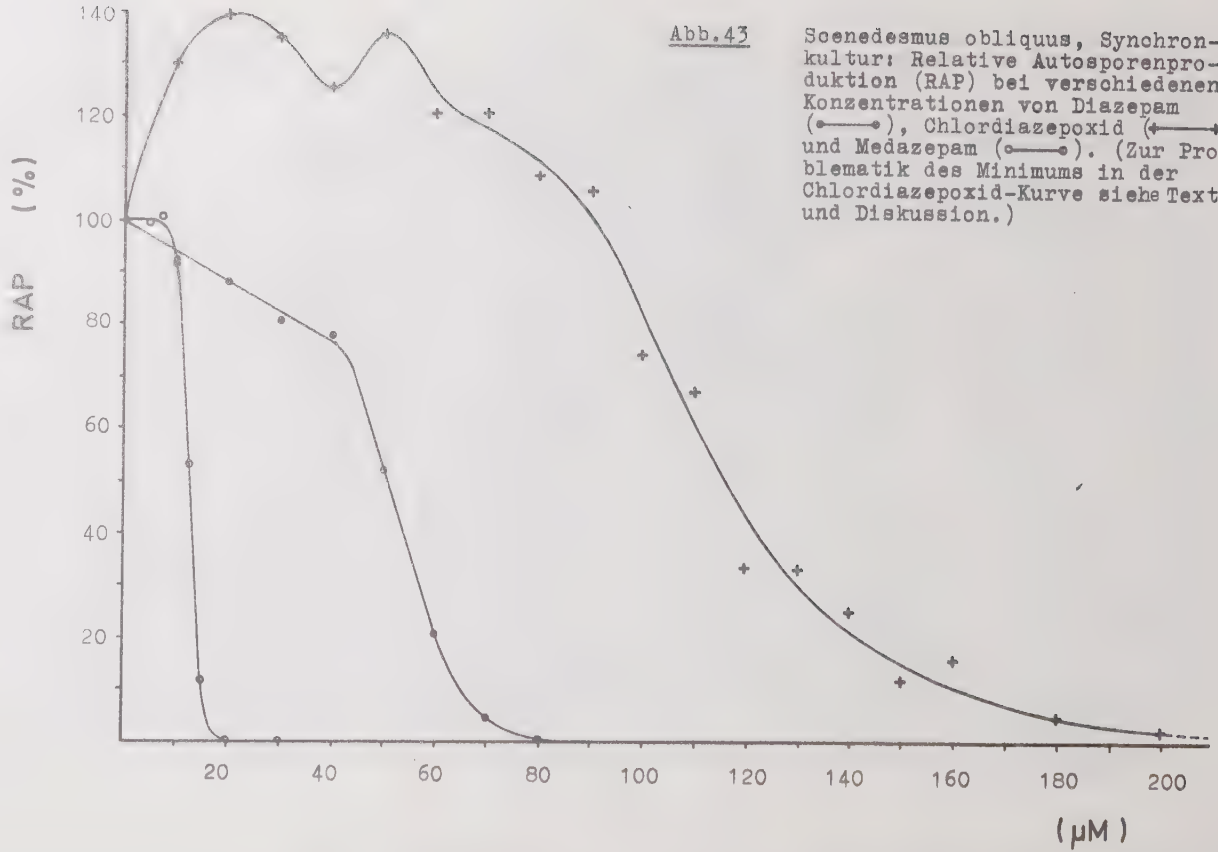


Abb.43

Scenedesmus obliquus, Synchronkultur: Relative Autosporenproduktion (RAP) bei verschiedenen Konzentrationen von Diazepam (●——●), Chlordiazepoxid (+——+) und Medazepam (○——○). (Zur Problematik des Minimums in der Chlordiazepoxid-Kurve siehe Text und Diskussion.)

der RAP. Das unterscheidet Medazepam auffällig von den beiden anderen Pharmaka. Allerdings wurden Medazepam nicht unter 5 µM und Diazepam nicht unter 10 µM auf ihre RAP untersucht.

Man könnte einwenden, daß die Färbung von Medazepam das (Teilungs-) Wachstum von Scenedesmus im Licht beeinträchtigen müßte. Das Kulturmedium wird nämlich durch Medazepam (beim pH ≈ 5,8)[1] gelblich-braun gefärbt. Deshalb absorbiert es im Blaubereich des Spektrums - maximal bei 457 nm (Abb. 44a). Zum Vergleich zeigt Abbildung 44b das Absorptionsspektrum einer Scenedesmus-Autosporensuspension mit relativer Zellzahl = 100. Das Autosporen-minus-Medazepam-Differenzspektrum (in Abbildung 44: b-minus-a-Kurve) zeigt deutlicher, in welchem Teil des spektralen Blaubereichs den Autosporen Lichtenergie "vorenthalten" wird.

Bei der geringen Lichtabsorption durch die hier verwendete Konzentration von 20 µM Medazepam ($E^{1\,cm}_{457\,nm}$ = 0,05) ist jedoch noch nicht mit einem wesentlichen Einfluß auf das Wachstum der Kulturen zu rechnen.

Zum Beweis wurde eine 100 ml-Kulturröhre mit einem Querschnittsradius von 1,5 cm konzentrisch von einem 3 cm dicken zylindrischen Mantel aus einer Medazepam-Lösung (pH = 5,8)[1] in einem Becherglas umschlossen. Die eingeschlossene Kulturröhre enthielt während eines LDW eine normale Scenedesmus-Synchronkultur mit relativer Zellzahl = 100, deren Autosporenproduktion mit der einer mantellosen Kontrollkultur verglichen wurde. Bei je einem Versuch mit 10 und 20 µM Medazepam in der Lösung des Mantels ergab sich keine Differenz zur Autosporen-

---

[1] Bei pH ≥ 6,0 fällt Medazepam als weißer Niederschlag aus.

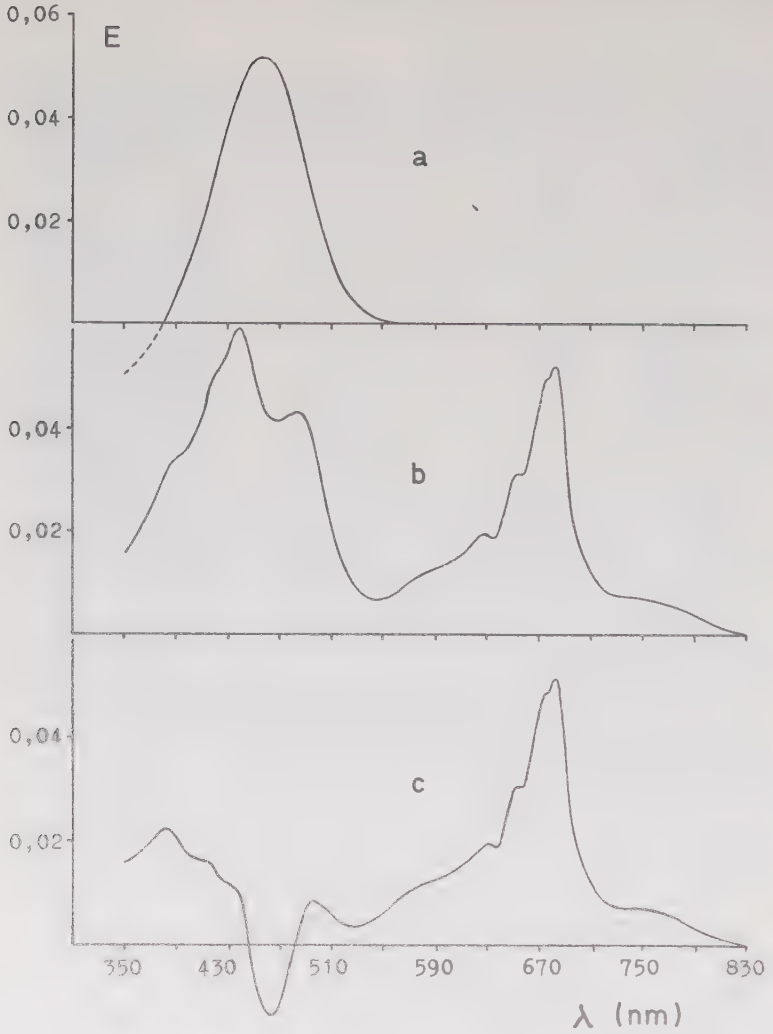


Abb.44

(a) Absorptionsspektrum einer 20 µM Medazepam-Lösung in normaler Nährlösung beim pH = 5,8 gegen normale Nährlösung gemessen.
(b) Absorptionsspektrum einer Autosporensuspension am Beginn der LDW (rel.Z% = 100) gegen normale Nährlösung.
(c) Autosporen-minus-Medazepam (b-minus-a) Differenzspektrum. - Schichtdicke bei allen Messungen: 1 cm.

Die Abszissenwerte von (c) gelten auch für (a) und (b).

produktion der Kontrolle. Gleichzeitig mit 20 µM Medazepam in der Nährlösung gewachsene Zellen teilten sich wie üblich überhaupt nicht.

Da das Licht gleichzeitig aus sehr unterschiedlichen Richtungen in die Kulturröhren eingestrahlt wird (großflächige Lichtquellen und Reflektoren), ist es sehr schwierig, die durch das gefärbte Gift durchschnittlich für eine Zelle geminderte Quanteneinstrahlung zu berechnen. Zusätzlich erschwerend ist die für das Algenwachstum nicht im einzelnen bekannte Relevanz der verschiedenen Wellenlängen im gemeinsamen Absorptionsbereich von Algenpigmenten und Medazepam. Schließlich müßte auch das Emissionsspektrum der Lichtquellen und Reflektoren der Kulturanlage berücksichtigt werden.

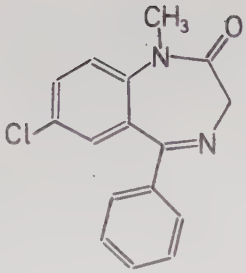
Man kann aber in grober Näherungsbetrachtung annehmen, daß eine Zelle im Medazepam-Medium durchschnittlich nicht mehr als einen Querschnittsradius der Kulturröhre (1,5 cm) an gefärbter Lösung zwischen sich und der Lichtquelle hat. So müßte in einem 3 cm dicken Mantel weniger als die halbe Farbstoffkonzentration genügen (nicht alle Strahlen nehmen den kürzesten Weg durch den Mantel), um dieselbe Absorptionskraft wie die volle Konzentration im Kulturmedium selbst zu erzeugen. Die halbe wie sogar die ganze Medazepam-Konzentration (20 µM) im Mantel hatten jedoch keine Wirkung.

Die Färbung von Medazepam spielte demnach keine meßbare Rolle bei der Teilungshemmung durch das Arzneimittel.

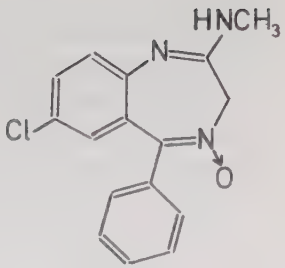
(E) D I S K U S S I O N

1. Die Ergebnisse zeigten, daß Diazepam etwa zwischen 10^{-5} und 10^{-4} M das Wachstum von Scenedesmus zunehmend mit steigender Konzentration hemmt. Auffällig war die oberhalb 40 µM plötzlich schneller zunehmende Hemmung der Produktion (gemessen bei RAP, Gesamtstickstoff, Chlorophyll und Kohlenhydrat). Da Chlordiazepoxid zwischen 10 und 90 µM stimulierend auf die Autosporenproduktion wirkt, scheint es nicht ausgeschlossen, daß auch Diazepam bis 40 µM eine Stimulation erzeugt, die aber von einer gleichzeitig wirkenden Inhibition überkompensiert wird. Vielleicht wird auch bis 40 µM Diazepam nur ein Prozeß in der Zelle verlangsamt und ab 40 µM zusätzlich ein zweiter. Über eventuell beteiligte Mechanismen bestehen aber keine begründeten Vorstellungen. Es dürfte sich jedoch um relativ spezifische Wechselwirkungen zwischen Pharmakon und molekularen Strukturen der Zellen handeln, da die geringen Unterschiede in den Substituenten des Benzodiazepin-Grundgerüstes bei Chlordiazepoxid, Diazepam und Medazepam (Abb. 45) so ausgeprägte Verschiedenheiten in der Wirkung erzeugen. Dies gilt um so wahrscheinlicher als bekannt ist, daß sogar Enantiomere desselben Arzneimittels (auch bei einem untersuchten Benzodiazepin) sehr unterschiedliche biochemische bzw. pharmakologische Aktivitat entfalten können (ELLIS, 1969; ANGELIS et al., 1972). Das gleiche kann auch für "isostere" Verbindungen zutreffen (BÜCHI et al., [illegible]).

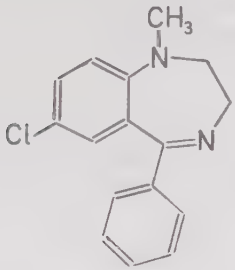
Besonders schwierig ist es, für das Minimum der RAP-Stimulierung bei 40 µM Chlordiazepoxid eine Erklärung zu finden. Da das Minimum gegenüber den Maxima



Diazepam



Chlordiazepoxid



Medazepam

Abb.45

Strukturformeln der 3 verwendeten 7-Chlor-5-phenyl-1,4-benzodiazepine.

statistisch noch nicht gesichert werden konnte, bleibt es hypothetisch. Es wurde aber in der Abbildung 43 wiedergegeben, weil es in allen fünf durchgeführten Versuchen zu finden war. Bis zu einer genaueren Prüfung erscheinen denkbare Erklärungen zu

spekulativ, um hier erörtert zu werden.

2. Bei allen Messungen der Stoffproduktion von synchronisierten Scenedesmen machte sich die hemmende Wirkung von Diazepam nach etwa der 6. Stunde des LDW in verstärktem Maße bemerkbar. Bei der DNA- und Kohlenhydrat-Produktion könnte man dies damit erklären, daß auch die Kontrollen in den ersten 6 Lichtstunden sehr wenig synthetisieren. Beim Gesamtstickstoff, Chlorophyll und besonders bei der RNA, die in den ersten 6 Stunden am stärksten zunimmt, erkennt man dagegen, daß auch die vergifteten Zellen zunächst eine - wenn auch etwas verminderte - Synthesefähigkeit behalten haben. Nach der 6. Stunde läßt bei den stärker vergifteten Zellen dann die Produktivität nach.

   Man könnte daraus schließen, daß Diazepam erst nach einer gewissen "Inkubationszeit" voll wirksam wird - sei es wegen sehr langsamer Aufnahme durch die Zellen, wegen langsamer Metabolisierung in wirksamere Verbindungen, wegen spezifischer Wirkungen, die zu Beginn des Zell-Zyklus noch nicht von Bedeutung für das Wachstum sind, oder aus anderen Gründen. Dies müßte aber entweder mit dem Entwicklungsstand der Zellen oder mit der Wirkung des Lichts zusammenhängen, denn in einem hier nicht beschriebenen Versuch hatte die Zugabe des Pharmakons (80 µM) zu Beginn der Dunkelzeit eines LDW in den ersten 9 Stunden der folgenden Lichtzeit auf Chlorophyllsynthese und O_2-Produktion im Licht dieselbe Wirkung wie eine Applikation erst zu Beginn dieser Lichtzeit.

   Für eine erforderliche Inkubationszeit (im Licht) spricht auch die Tatsache, daß Zugabe von Diazepam (80 µM) erst nach 6 Lichtstunden bereits eine

50 %ige RAP am Ende des LDW ergibt (Abb. 3), obwohl nach 6 Stunden im Vergleich zum Ende der 14. Stunde erst geringe Mengen der gemessenen Stoffwechselprodukte erzeugt worden sind. Besonders deutlich zeigt das die DNA-Synthese (Abb. 5): Würde hier das nach 6 Lichtstunden applizierte Diazepam ebenso wirksam wie das bei Beginn des LDW zugesetzte, so dürfte nur eine minimale DNA-Synthese folgen, was aber im Widerspruch zu einer RAP von 50 % stünde.

In einer etwas anderen Weise könnte der verlangsamte Kohlenhydratabbau schwach diazepam-vergifteter Zellen als "Spätwirkung" des Pharmakons gedeutet werden (siehe Abb. 7, 8 und 9): Während der Aufbau der Kohlenhydrate in der Lichtzeit durch 20 bis 40 µM Diazepam wenig beeinflußt wird, ist deren Abbau - besonders in den letzten 6 Stunden der Dunkelphase - im Vergleich zu den Kontrollen gehemmt. Da aber 80 und 160 µM Diazepam, das erst zu Anfang der Dunkelzeit zugegeben wird, den Kohlenhydratabbau etwas steigert (Tabelle 1), kann bei dem verminderten Abbau der vom Beginn des LDW an schwach vergifteten Zellen eine indirekte Wirkung des Pharmakons angenommen werden: es wäre denkbar, daß eine bereits in der Lichtzeit verminderte Synthese von Glycolyse- oder Atmungsenzymen den gehemmten Stärkeabbau in der folgenden Dunkelzeit verursacht.

3. Die Frage, in welcher Weise die Photosynthese durch Diazepam beeinflußt wird, kann nicht mit Sicherheit beantwortet werden.

Die verminderten Absolutwerte der Nettophotosynthese von vergifteten Kulturen lassen sich mindestens teilweise auf die allgemein verminderte Stoffproduktion in Gegenwart von Diazepam zurückführen. So nimmt

u.a. der Chlorophyllgehalt bei 80 µM Diazepam im Verlauf eines LDW kaum noch zu und bleibt bei 160 µM etwa konstant (Abb. 13), während Dauerlichtkulturen mit 160 µM Diazepam langsam ausbleichen (Abb. 31a). Bei heterotrophen asynchronen Kulturen ist die Chlorophyllsynthese ebenfalls gehemmt. Damit erklärte sich die verminderte Netto-Photosynthese als indirekte Wirkung.

Der Abfall der O_2-Produktion vergifteter Zellen während des LDW unter den Anfangswert und das stark erhöhte Chlorophyll/O_2-Verhältnis (Abb. 16 bzw. 14) bedürfen aber einer differenzierteren Erklärung. Drei Möglichkeiten müssen dabei in Betracht gezogen werden: Erstens eine unspezifische Photooxydation; darüber stehen keine Hinweise zur Verfügung. Zweitens könnte eine Leistungsminderung des Photosynthese-Apparates und drittens eine entsprechend gesteigerte Atmungsrate im Licht in Frage kommen.

Die im Dunkeln nach Belichtung gemessene Atmungsrate kann nur mit großen Vorbehalten als der auch im Licht stattfindende O_2-Verbrauch angenommen werden (vgl. Abschnitt D 1 b). Zwar wurde niemals nach Ausschalten des Lichts eine vorübergehend erhöhte (BRACKETT et al., 1953; DAMASCHKE, 1958 - an Chlorella) oder wie von RIED (1968) unter etwas anderen Bedingungen bei Chlorella festgestellte oszillierende O_2-Aufnahme beobachtet, aber damit allein kann nicht mit befriedigender Sicherheit auf die O_2-Aufnahme im Licht geschlossen werden. Für eine gesteigerte O_2-Aufnahme im Licht durch Licht- o d e r Dunkelatmung bei Algen (auch bei Scenedesmus) sprechen trotz sehr kontroverser Befunde eine Reihe von Ergebnissen (HOCH et al., 1963; SCHMID und SCHWARZE, 1969; KOWALLIK und SCHMID, 1971; KOWALLIK, 1971;

BUNT und HEEB, 1971; CODD et al., 1972; STABENAU, 1973). So können eine über die gemessene Atmungsrate hinausgehende Beeinflussung der Netto-Photosynthese bei diazepam-vergifteten Scenedesmen (und Kontrollen) und damit ein noch niedrigeres Chlorophyll/O_2-Verhältnis nicht ausgeschlossen werden.

Für eine diazepam-bedingte Störung des Photosynthese-Apparats gibt es andererseits einige direkte Hinweise: Die erschwerte Extrahierbarkeit der Chlorophylle, die Auflockerung der Thylakoidstapelung und das Erscheinen von Plastoglobuli könnten als Struktur- und molekulare Effekte gedeutet werden, welche die photosynthetische Leistung herabsetzen. Möglicherweise sind diese Effekte noch von einem Chlorophyllabbau (siehe das Ausbleichen im Dauerlicht) und/oder gehemmter Chlorophyllsynthese begleitet. Schließlich wurde im Verlauf des LDW nur bei der O_2-Produktion ein Absinken unter die Anfangswerte beobachtet. So kann vermutet werden, daß Diazepam mehr oder weniger direkt die photosynthetischen Reaktionen beeinflußt.

4. Erstaunlich war, daß mit den Gestalt und Größenänderungen der Mitochondrien in vergifteten Zellen keine deutliche Veränderung der Dunkelatmungs-Rate einherging.

KADENBACH und LÜHRS stellten schon 1961 eine Schwellung von Mitochondrien der Rattenleber in vitro durch ein anderes Benzodiazepin, Chlordiazepoxid, bei gleichzeitiger Hemmung der Oxydation NADH-liefernder Substrate durch Sauerstoff fest. Die Mitochondrienschwellung, die in vivo und in vitro durch verschiedene Substrate und Gifte erzeugt werden kann (LEHNINGER, 1959; CALVAYRAC, 1970; CALVAYRAC und BUTOW, 1971; KIMBERG und LOEB, 1972;

TANDLER und HOPPEL, 1973) und sogar im normalen Zellzyklus von Chlamydomonas vorzukommen scheint (OSAFUNE et al., 1972), ist kein spezifischer Diazepam-Effekt und kann auch von Atmungssteigerungen begleitet sein (CALVAYRAC und BUTOW, 1971 - bei Euglena). Diazepam scheint dagegen weder stimulierend noch hemmend auf die Dunkelatmung zu wirken, wenn man voraussetzt, daß die Atmungskapazität vergifteter Scenedesmen während des LDW nicht durch Wachstum oder Zellabbau verändert wurde (Abb. 15).

5. Neben dem mitochondrialen Elektronentransport könnte für die Schwellung der Mitochondrien auch die oxydative Phosphorylierung eine Rolle spielen (BEYER et al., 1955; CHANCE und PACKER, 1958; HACKENBROCK, 1966 und 1972) und vielleicht zusätzlich Ionentransportprozesse (PRICE et al., 1956; CHANCE und PACKER, 1958).

   Obwohl noch unklar ist, welche Rolle ATP bei der Mitochondrienschwellung spielt, konnten doch geschwollene Mitochondrien in vitro z.T. allein mit exogenem ATP, meist aber mit ATP plus Mg^{2+} und anderen Zusätzen sowie mit ADP wieder zur Kontraktion veranlaßt werden (PRICE et al., 1956; LEHNINGER, 1959; SONER et al., 1964).

   Die Wirkung von exogenem (in diesem Fall extrazellulärem!) ATP auf die Größenänderung der Mitochondrien von diazepam-behandelten Scenedesmus-Zellen wurde nicht untersucht. Librium-bedingte Mitochondrienschwellungen in vitro konnten aber von KADENBACH und LÜHRS (1961) mit $5 \cdot 10^{-5}$ M ATP ($+Mg^{2+}$) teilweise rückgängig gemacht werden.

   So scheint ein Zusammenhang zwischen der ATP-Wirkung auf Mitochondrien und dem Wachstum von Scenedesmus

nicht ausgeschlossen. Über den Mechanismus einer solchen Wirkung gibt es aber noch keine konkreten Vorstellungen.

6. Eine von Diazepam gehemmte Rb^+-Netto-Aufnahme konnte durch die Versuche mit Rb-86 gezeigt werden. ATP hatte jedoch unter den gewählten experimentellen Bedingungen keine Gegenwirkung gezeigt. Im Gegensatz dazu konnten JYUNG et al. (1965) eine DNP-bedingte Rb^+-Aufnahme-Hemmung bei isolierten Tabakzellen mit exogenem ATP aufheben. MENGEL (1963) gelang dies teilweise auch an Gerstenwurzeln mit ATP, ADP und AMP. Bei der auf das Wachstum von Scenedesmus beobachteten ATP-Wirkung muß aber immer bedacht werden, daß diese nur bei pH = 4 bis 5 - also schon relativ hohen H^+-Konzentrationen - festgestellt wurden. Bei niederem pH ist aber die Aufnahme vieler anderer Ionen gehemmt (FRIED und NOGGLE, 1958; ULLRICH-EBERIUS und SIMONIS, 1970; ULLRICH, 1972; ULLRICH-EBERIUS, 1973). Möglich bleibt auch, daß Diazepam gar nicht die Brutto-Rb^+-Aufnahme hemmt, sondern den (ATP-unabhängigen) Ausstrom von Rb^+ erleichtert.

   Wurde der pH-Wert der Kontrollen, der Diazepam- und der ATP-Proben gleichermaßen auf 4 bis 4,5 eingestellt, so verminderten sich die relativen Unterschiede in der Rb^+-Aufnahme (vgl. Abb. 18b mit 19b). Da aber noch zusätzliches Adenosin und Phosphat in den ATP-freien Proben war, wird zur besseren Deutung der ganzen Effekte eine genauere Analyse des Einflusses aller Zusätze erforderlich sein. So kann z.B. Phosphat die Rb^+-Aufnahme steigern (KYLIN, 1967).

   Bemerkenswert bleibt in jedem Fall die durch Diazepam schon nach 0,5 und 2,0 Stunden gehemmte Rb^+-Aufnahme: Hier wurde eine Diazepam-Wirkung schon zu einem Zeit-

punkt festgestellt, zu dem der Einfluß eines allgemein verzögerten Wachstums noch sehr gering sein dürfte.

Vom Verhalten des Rb^+ kann mit recht großer Wahrscheinlichkeit auf dasjenige von K^+ geschlossen werden, weil beide Ionen offenbar um denselben Aufnahmemechanismus konkurrieren (EPSTEIN und HAGEN, 1952; FRIED und NOGGLE, 1958; BANGE und OVERSTREET, 1960) und weil in speziellen Fällen K^+ durch Rb^+ teilweise oder vollständig ersetzt werden kann (KELLNER, 1955; BAUM und O'KELLEY, 1966). K^+ wiederum hat einen wesentlichen Einfluß auf die Aufnahme anderer Ionen und damit auf den ganzen Stoffwechsel (zuletzt: ULLRICH-EBERIUS, 1973).

7. Insgesamt wurde also ein relativ breites Spektrum morphologischer und physiologischer Wirkungen von Diazepam auf Scenedesmus obliquus festgestellt. Bei der Verschiedenartigkeit der diazepam-bedingten Veränderungen stellt sich die Frage, ob diese Vorgänge unabhängig nebeneinander oder kausal verbunden nacheinander ablaufen. Eine sichere Antwort auf diese Frage ist noch nicht möglich. Als bis jetzt einfachste gemeinsame Erklärung für viele der beschriebenen Wirkungen von Diazepam auf Scenedesmus bietet sich aber die Annahme eines wie auch immer verursachten Energie-(ATP-)Mangels an: Damit ließe sich die verminderte Syntheseleistung, die gehemmte Rubidium-Aufnahme, das Verschwinden der Stärke aus den Plastiden, auch die Wachstumshemmung von Petroselinum-Zellen trotz eines großen Nährstoffangebots in der Nährlösung (Anhang 1) und vielleicht auch die Schwellung der Mitochondrien erklären (BEYER et. al., 1955). Dabei ist es besonders nach den elektronen-

mikroskopischen Beobachtungen nicht ausgeschlossen, daß (molekulare) Effekte des Pharmakons auf mehrere Membransysteme der Zellen eine Rolle spielen.

Schlußbemerkung

In der vorliegenden Arbeit wurden Diazepam-Wirkungen hauptsächlich im Konzentrationsbereich von 10^{-5} bis 10^{-4} M untersucht. Das entspricht etwa 3 bis 30 mg Diazepam pro Liter Nährlösung.

Die klinisch meist verwendete Dosis liegt im Bereich von 5 bis 20 (evtl. 40) mg täglich für einige Tage oder Wochen. So scheint die bei Scenedesmus verwendete Dosis sehr hoch - allerdings ungeachtet der Frage, wieviel Diazepam von den Algen aufgenommen wurde bzw. wie die Konzentrationsverteilung im menschlichen (und tierischen) Körper aussieht.

Da praktisch jede Substanz und damit auch jedes Pharmakon bei genügend hoher Dosierung toxisch wirkt, ist es nicht von vornherein selbstverständlich, ein Arzneimittel als Gift zu bezeichnen, wie es in dieser Arbeit hin und wieder getan wurde. Das gilt um so mehr, als die relativ geringe Toxizität von Diazepam auch bei sehr hohen Dosen wahrscheinlich gemacht wurde (Übersicht bei STERNBACH et al., 1964).

Andererseits werden von vielen Zellgiften wie Chloramphenicol, 2,4-Dinitrophenol, Colchicin u.a. gleiche und auch viel höhere Konzentrationen als 10^{-4} M erforderlich, um beispielsweise Wachstum und Zellteilung bei Algen zu blockieren. Trotzdem wird auch dabei von Hemmstoffen und Giften gesprochen. Diesem Sprachgebrauch folgend wird auch Diazepam für die hier untersuchten Organismen manchmal als Gift bezeichnet.

(F) L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

ANGELIS, L. de, M. PREDOMINATO, and R. VERTUA: Stereostructure - activity relationship for oxazepam-hemisuccinate. - Effects on central nervous system. Arzneim. Forsch. 22, 1328-1333 (1972).

ARNOLD, C.-G., und D. CRUSE: Die Wirkungen von Thalidomid auf die Embryonalentwicklung von Arabidopsis thaliana. Z. Pflanzenphysiol. 56, 292-294 (1967).

BANGE, G.G.J., and R. OVERSTREET: Absorption of cesium by excised barley roots. Plant Physiol. 35, 605-609 (1960).

BAUM, L.S., and J.C. O'KELLEY: Rubidium substitution for potassium in several species of fresh water algae. Plant Physiol. Proc. Ann. Meetings 41, XXXIV (1966).

BEYER, R.E., L. ERNSTER, H. LÖW, and T. BEYER: Correlation of optical density and oxidative phosphorylation in reconstructed mitochondrial systems. Experimental Cell Res. 8, 586-588 (1955).

BISHOP, N.I., and H. SENGER: Preparation and photosynthetic properties of synchronous cultures of Scenedesmus. In: "Methods in enzymology", COLOWICK, S.P., and N.O. KAPLAN (ed.) Vol. XXIII Part A, A. San PIETRO (ed.) Academic Press, New York (1971), S. 53-66.

BONEY, A.D.: Abnormal growth of sporelings of a marine red alga induced by thalidomide. Nature 198, 1068-1069 (1963).

BOTHE, H.: Ferredoxin und Phytoflavin in photosynthetischen Reaktionen einer Präparation aus der Blaualge Anacystis nidulans. Dissertation, Göttingen, 1968.

BRACKETT, F.S., R.A. OLSON, and R.G. CRICKARD: Respiration and intensity dependence of photosynthesis in Chlorella. J. gen. Physiol. 36, 529-561 (1953).

BRADSTREET, R.B.: The Kjeldahl method for organic nitrogen. Academic Press, New York, 1965.

BÜCHI, J., L.T. OEY, und X. PERLIA: Zusammenhänge zwischen der chemischen Konstitution, den physikalisch-chemischen Eigenschaften, der chemischen Reaktivität und der lokalanästhetischen Wirksamkeit einiger Procain-Isostere. 29. Mitteilung. Arzneim. Forsch. 22, 1071-1084 (1972).

BUNT, J.S., and M.A. HEEB: Consumption of O_2 in the light by Chlorella pyrenoidosa and Chlamydomonas reinhardii. Biochim. Biophys. Acta 226, 354-359 (1971).

BURTON, K.: A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. Biochem. J. 62, 315-323 (1956).

CALVAYRAC, R.: Relation entre les substrats, la respiration et la structure mitochondriale chez Euglena gracilis (Z). Arch. Mikrobiol. 73, 308-314 (1970).

--, and R.A. BUTOW: Action de l'antimycine A sur la respiration et la structure des mitochondries d'Euglena gracilis Z. Arch. Mikrobiol. 80, 62-69 (1971).

CERIOTTI, G.: Determination of nucleic acids in animal tissues. J. biol. Chem. 214, 59-70 (1955).

CHANCE, B., and L. PACKER: Light-scattering and absorption effects caused by addition of adenosine diphosphate to rat-heart-muscle sarcosomes. Biochem. J. 68, 295-297 (1958).

CODD, G.A., G.H. SCHMID, and W. KOWALLIK: Enzymic evidence for peroxisomes in a mutant of Chlorella vulgaris. Arch. Mikrobiol. 81, 264-272 (1972).

DALTON, A.J.: A chrome-osmium fixative for electron microscopy. Anat. Record 121, 281 (1955).

DAMASCHKE, K.: Messung von Sauerstoffumsätzen an Grünalgen. In: "Elektrochemische Sauerstoffmessungen". TÖDT, F. (ed.), Walter de Gruyter u. Co, Berlin, 1958, S. 58-70.

ELLIS, R.J.: Chloroplast ribosomes: Stereospecificity of inhibition by chloramphenicol. Science 163, 477-478 (1969).

EPSTEIN, E., and C.E. HAGEN: A kinetic study of the absorption of alkali cations by barley roots. Plant Physiol. 27, 457-474 (1952).

FRIED, M., and J.C. NOGGLE: Multiple site uptake of individual cations by roots as affected by hydrogen ion. Plant Physiol. 33, 139-144 (1958).

GIACOMELLO, G., P. MALATESTA, and G. QUAGLIA: Action of Thalidomide on radical meristems of Allium cepa. Nature 201, 940-941 (1964).

GLEISS, J.: Weitere Untersuchungen zur wachstumshemmenden Wirkung von Schlafmitteln bei Embryonen von Sinapis alba. Arzneim. Forsch. 17, 1548-1551 (1967).

HACKENBROCK, C.R.: Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. J. Cell Biol. 30, 269-297 (1966).

-- : Energy-linked ultrastructural transformations in isolated liver mitochondria and mitoplasts. J. Cell Biol. 53, 450-465 (1972).

HOCH, G., O.v.H. OWENS, and B. KOK: Photosynthesis and respiration. Arch. Biochem. Biophys. 101, 171-180 (1963).

JYUNG, W.H., S.H. WITTWER, and M.J. BUKOVAC: Ion uptake by cells enzymically isolated from green tobacco leaves. Plant Physiol. 40, 410-414 (1965).

KADENBACH, B., and W. LÜHRS: Effects of 7-Chloro-2-methylamino-5-phenyl-3H-1,4-benzodiazepin-4-oxide on mitochondria from rat liver and brain. Nature 192, 174-176 (1961).

KELLNER, K.: Die Adaptation von Ankistrodesmus braunii an Rubidium und Kupfer. Biol. Zentralbl. 74, 662-691 (1955).

KIMBERG, D.V., and J.N. LOEB: Effects of cortisone administration on rat liver mitochondria. - Support for the concept of mitochondrial fusion. J. Cell Biol. 55, 635-643 (1972).

KOWALLIK, W.: Light stimulated respiratory gas exchange in algae and its relation to photorespiration. In: "Photosynthesis and photorespiration". HATCH, M.D., C.B. OSMOND, and R.O. SLATYER (ed.), Wiley-Interscience, New York, 1971, S. 514-522.

--, und G.H. SCHMID: Zur Glycolatoxydation einzelliger Grünalgen. Planta 96, 224-237 (1971).

KRATZ, W.A., and J. MYERS: Nutrition and growth of several blue-green algae. Amer. J. Bot. 42, 282-287 (1955).

KUHL, A.: Zur Physiologie der Speicherung kondensierter anorganischer Phosphate in Chlorella. In: Vorträge aus dem Gesamtgebiet der Botanik. Hrsg. Dtsch. Bot. Ges., Neue Folge Nr. 1, 157-166 (1962).

KYLIN, A.: Ion transport in P-deficient Scenedesmus upon readdition of phosphate in light and darkness. II. Uptake of Rb^+, Cs^+, Ca^{2+}, and Sr^{2+}. Z. Pflanzenphysiol. 56, 81-90 (1967).

LÄUCHLI, A.: Radioassay for β-emitters in biological materials using Cerenkov radiation. Intern. J. Appl. Radiat. Isotopes 20, 265-270 (1969).

LEHNINGER, A.L.: Reversal of various types of mitochondrial swelling by adenosine triphosphate. J. Biol. Chem. 234, 2465-2471 (1959).

LORENZEN, H.: Die photosynthetische Sauerstoffproduktion wachsender Chlorella bei langfristig intermittierender Belichtung. Flora 147, 382-404 (1959).

-- : Temperatureinflüsse auf Chlorella pyrenoidosa unter besonderer Berücksichtigung der Zellentwicklung. Flora 153, 554-592 (1963).

-- : Synchronous cultures. In: "Photobiology of microorganisms". P. HALLDAL (ed.), Wiley Interscience, London, 1970, S. 187-212.

--, und H.-G. RUPPEL: Versuche zur Gliederung des Entwicklungsverlaufs der Chlorella-Zelle. Planta 54, 394-403 (1960).

--, und G.S. VENKATARAMAN: Synchronous cell divisions in Anacystis nidulans RICHTER. Arch. Mikrobiol. 67, 251-255 (1969).

LUFT, J.H.: Improvements in epoxy resin embedding methods. J. Biophys. Biochem. Cytol. 9, 409-414 (1961).

MACKINNEY, G.: Absorption of light by chlorophyll solutions. J. Biol. Chem. 140, 315-322 (1941).

MENGEL, K.: Der Einfluß von ATP-Zugaben und weiterer Stoffwechselagenzien auf die Rb-Aufnahme abgeschnittener Gerstenwurzeln. Physiol. Plantarum 16, 767-776 (1963).

MÜLLER, H.M.: Über die Veränderung der chemischen Zusammensetzung von Scenedesmus obliquus bei synchroner Kultur im Licht-Dunkel-Wechsel. Planta 56, 555-574 (1961).

OSAFUNE, T., S. MIHARA, E. HASE, and I. OHKURO: Electron microscope studies on the vegetative cellular life cycle of Chlamydomonas reinhardii DANGEARD in synchronous culture. I. Some characteristics of changes in subcellular structures during the cell cycle, especially in formation of giant mitochondria. Plant Cell Physiol. 13, 211-227 (1972).

PALADE, G.E.: A study of fixation for electron microscopy. J. exp. Med. 95, 285-298 (1952).

PARUPS, E.V., and I. HOFFMAN: Absense of growth effects of Thalidomide on higher plants. Nature 205, 1241-1242 (1965).

PASCHKE, M., und F. SCHWANITZ: Zum Problem der Vortestung von Arzneimitteln mit Hilfe niederer und höherer Pflanzen. I. Über die Wirkung von Phthalylglutaminsäureimid (Thalidomid) und anderen Schlafmitteln auf Teilungsgeschwindigkeit, Formgestaltung und Sexualität einiger Desmidiaceen. Arzneim. Forsch. 18, 1338-1341 (1968).

--, -- : --- II. Über die Wirkung von Phenacetin und einiger häufig mit dieser Substanz kombinierter Stoffe auf Formgestaltung und Wachstum von Micrasterias americana. Arzneim. Forsch. 21, 873-876 (1971a).

--, -- : --- III. Bestimmung der teilungsfördernden oder cytostatischen Wirkung von Medikamenten mit der Grünalge Haematococcus pluvialis FLOTOW. Arzneim. Forsch. 21, 1419-1422 (1971b).

PÄTAU, K.: Zur statistischen Beurteilung von Messungsreihen (Eine neue t-Tafel). Biol. Zbl. 63, 152-168 (1943).

PRICE, C.A., A. FONNESU, and R.E. DAVIES: Movements of water and ions in mitochondria. Biochem. J. 64, 754-768 (1956).

PRINGSHEIM, E.G.: Kleine Mitteilungen über Flagellaten und Algen. XVI. Lauterbornia (Anacystis) nidulans (RICHTER) nov. gen., nov. comb. Cyanophyceae. Arch. Mikrobiol. 63, 1-6 (1968).

REYNOLDS, E.S.: The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol. 17, 208-212 (1963).

RIED, A.: Interactions between photosynthesis and respiration in Chlorella. Biochim. Biophys. Acta 153, 653-663 (1968).

ROE, J.A.: The determination of sugar in blood and spinal fluid with anthrone reagent. J. biol. Chem. 212, 335-343 (1955).

RUPPEL, H.-G.: Untersuchungen über die Zusammensetzung von Chlorella bei Synchronisation im Licht-Dunkel-Wechsel. Flora 152, 113-138 (1962).

SCHMID, G.H., and P. SCHWARZE: Blue light enhanced respiration in a colorless Chlorella mutant. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 350, 1513-1520 (1969).

SCHNEPF, E., E. HEGEWALD, und C.-J. SOEDER: Elektonenmikroskopische Beobachtungen an Parasiten aus Scenedesmus - Massenkulturen. 2. Über Entwicklung und Parasit-Wirt-Kontakt von Aphelidium und virusartige Partikel im Cytoplasma infizierter Scenedesmus-Zellen. Arch. Mikrobiol. 75,209-229 (1971).

SCHROPP, W.: Der Vegetationsversuch. I. Die Methodik der Wasserkultur höherer Pflanzen. Methodenbuch, Bd.VII. Radebeul und Berlin: Neumann Verlag (1951).

SEITZ, U., und G. RICHTER: Isolierung und Charakterisierung schnell markierter, hochmolekularer RNS aus frei suspendierten Calluszellen der Petersilie (Petroselinum sativum). Planta 92, 309-326 (1970).

SENGER, H.: Charakterisierung einer Synchronkultur von Scenedesmus obliquus, ihrer potentiellen Photosyntheseleistung und des Photosynthese-Quotienten während des Entwicklungscyclus. Planta 90, 243-266 (1970).

--, and N.I. BISHOP: Quantum yield of photosynthesis in synchronous Scenedesmus cultures. Nature 214, 140-142 (1967).

SOLT, J., H. PASCHINGER, und E. BRODA: Die energieabhängige Aufnahme von Thallium durch Chlorella. Planta 101, 242-250 (1971).

STABENAU, H.: Untersuchungen über die Aufnahme von Glycolat bei Chlorogonium. Planta 109, 177-183 (1973).

STERNBACH, L.H., L.O. RANDALL, and S.R. GUSTAFSON: 1,4-Benzodiazepines (Chlordiazepoxide and related compounds). In: "Psychopharmacological agents", GORDON, M. (ed.), Academic Press, New York, 1964.

STONER, C.D., T.K. HODGES, and J.B. HANSON: Chloramphenicol as an inhibitor of energy-linked processes in maize mitochondria. Nature 203, 258-261 (1964).

TANDLER, B., and C.L. HOPPEL: Division of giant mitochondria during recovery from cuprizone intoxication. J. Cell Biol. 56, 266-272 (1973).

TANNER, W., und O. KANDLER: Die Abhängigkeit der Adaptation der Glucose-Aufnahme von der oxydativen und photosynthetischen Phosphorylierung bei Chlorella vulgaris. Z. Pflanzenphysiol. 58, 24-32 (1967).

TRUESDALE, G.A., A.L. DOWNING, and G.F. LOWDEN: The solubility of oxygen in pure water and sea-water. J. Appl. Chem. 5, 53-62 (1955).

ULLRICH, W.R.: Der Einfluß von CO_2 und pH auf die ^{32}P-Markierung von Polyphosphaten und organischen Phosphaten bei Ankistrodesmus braunii im Licht. Planta 102, 37-54 (1972).

ULLRICH-EBERIUS, C.I.: Die pH-Abhängigkeit der Aufnahme von $H_2PO_4^-$, $SO_4^=$ Na^+ und K^+ und ihre gegenseitige Beeinflussung bei Ankistrodesmus braunii. Planta 109, 161-176 (1973).

--, und W. SIMONIS: Der Einfluß von Natrium- und Kalium-Ionen auf die Photophosphorylierung bei Ankistrodesmus braunii. Planta 92, 358-373 (1970).

VENABLE, J.H., and R. GOGGESHALL: A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. J. Cell Biol. 25, 407-408 (1965).

WANKA, F.: Die Bestimmung der Nucleinsäuren in Chlorella-Kulturen. Planta 58, 594-609 (1962).

--, und GERAEDTS: Effect of temperature in the regulation of DNA synthesis in synchronous cultures of Chlorella. Exptl. Cell Res. 71, 188-192 (1972).

ZBINDEN, G., and L.O. RANDALL: Pharmacology of benzodiazepines: Laboratory and clinical correlations. Advance in Pharmacol. 5, 213-291 (1967).

ZELITCH, I.: Photosynthesis, photorespiration and plant productivity. Academic Press, New York, 1971.

Anhang 1

Zusammensetzung der Nährlösung für die Petroselinum-Suspensionskultur (nach SEITZ und RICHTER, 1970):

Menge (mg) pro Liter Nährlösung	Substanz
1900	KNO_3
1650	NH_4NO_3
440	$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$
370	$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$
170	KH_2PO_4
37,2	Na_2EDTA
27,8	$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$
6,2	H_3BO_3
22,9	$MnSO_4 \cdot 4\ H_2O$
8,6	$ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$
0,83	KJ
0,25	$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$
0,025	$CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$
0,025	$CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$
30000	Saccharose
100	meso-Inosit
29,7	L-Alanin
26,0	4-Aminobuttersäure
3,1	L-Arginin · HCl
3,8	L-Asparagin
1,7	L-Asparaginsäure
0,3	L-Glutamin
15,7	L-Glutaminsäure
2,7	Glycin
0,05	L-Histidin
5,0	L-Leucin

Fortsetzung von Anhang 1

Menge (mg) pro Liter Nährlösung	Substanz
2,0	L-Lysin · HCl
0,05	DL-Methionin
0,05	DL-Phenylalanin
1,9	L-Prolin
12,8	L-Serin
4,1	DL-Threonin
0,05	L-Tyrosin
2,3	DL-Valin
3,0	L-Cystin
0,5	Nicotinsäure
0,1	Thiamin · HCl
0,1	Pyridoxin · HCl
2,0	Indolessigsäure
0,2	Kinetin
0,1	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
(10000	Difco-Bacto-Agar - nur für die Agar-Stammkulturen)

Anhang 2

Zusammensetzung des Mineralsalzmediums der stehenden Wasserkultur von Pisum:

Konzentration (M)	Substanz
10^{-2}	KNO_3
$3{,}4 \cdot 10^{-3}$	KH_2PO_4
$6 \cdot 10^{-4}$	$Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$
10^{-3}	$CaCl_2$
10^{-3}	$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$
$5 \cdot 10^{-4}$	$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$
$5 \cdot 10^{-4}$	Titriplex III
10^{-6}	H_3BO_3
10^{-6}	$MnSO_4 \cdot H_2O$
10^{-6}	$ZnSO_4$
10^{-8}	$CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$
10^{-8}	$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4\ H_2O$

pH = 5,5

Anhang 3

Abb. A 1

Eichkurven zur Bestimmung von 2-Desoxy-D-ribose (Merck), (durchgezogene Kurven) und Desoxyribonucleinsäure, reinst, aus Kälberthymus (Serva), (unterbrochene Kurven). Bestimmung mit der Diphenylamin-Reaktion nach BURTON (1956) nach unterschiedlichen Vorbehandlungen, die den Extraktionsbedingungen für Algen entsprechen (s. Tab. zu Abb. A 1). Die Perchlorsäure-Konzentrationen bei den "Extraktionen" wurden jeweils auch zur Diphenylamin-Reaktion mit Ausnahme von 6a verwendet. (6a wurde wie 6 vorbehandelt aber vor der Diphenylamin-Reaktion auf 0,5 N $HClO_4$ verdünnt. Damit wird gezeigt, daß auch bei der Farbreaktion in Gegenwart von 2 N gegenüber 0,5 N $HClO_4$ noch Verluste entstehen.)

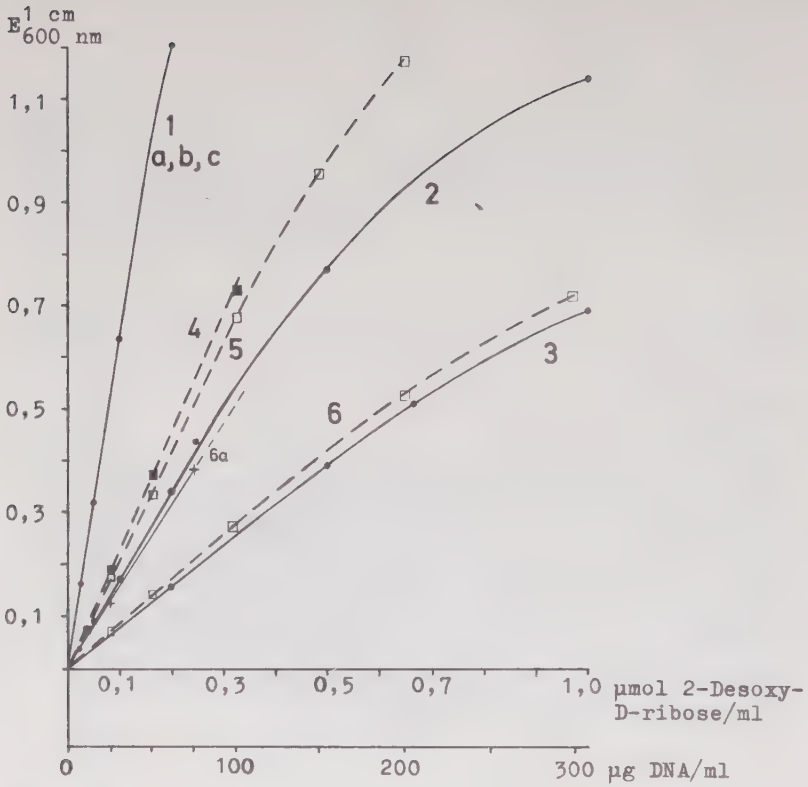


Abbildung A 1

Kurve in Abb. A 1	Vorbehandlung			Eichsubstanz
	Dauer (min)	Temperatur (° C)	$HClO_4$-Konz. (N)	
1a	15	70	0,5	2-Desoxy-D-ribose
b	30	70	0,5	
c	360	45	0,5	
2	15	70	2,0	
3	30	70	2,0	
4	15	70	0,5	DNA
5	360	45	0,5	
6	30	70	2,0	
6a	(siehe Text zur Abb. A 1)			

Tabelle zu Abbildung A 1

Meinem Lehrer, Herrn Prof. Dr. F. Amelunxen, danke ich für die Anregungen zu dem Thema und bei der endgültigen Abfassung dieser Arbeit.

Herrn Dr. E. Spieß danke ich für praktische Hilfen und die Bereitstellung der Petroselinum-Suspensionskultur.

Mein besonderer Dank gilt all denen, die durch Diskussionen und Materialbereitstellung die Weiterführung dieser Arbeit erleichtert haben.

Der Fa. Hoffmann-La Roche AG, Grenzach, wird für die Überlassung der verwendeten Benzodiazepine gedankt.

Von Juni 1972 an wurde diese Arbeit durch ein Stipendium nach dem Graduiertenförderungsgesetz unterstützt.

Lebenslauf

Kurt Ober, geboren am 15. Januar 1939 in Darmstadt als Sohn des Kaufmanns Albert Ober und seiner Ehefrau Hermine, geb. Küpper.

1945 - 1950 : Grundschule in Darmstadt

1950 - 1959 : Lichtenbergschule, Gymnasium in Darmstadt

28. Febr. 1959 : Reifeprüfung

Juli 1959 bis Juni 1962 : Wehrdienst in der Bundeswehr

November 1962 bis Juli 1964 : Studium Rechtswissenschaft, FU Berlin und Universität Freiburg/ Breisgau

November 1964 bis Juli 1970 : Studium Biologie und Chemie, Universität Göttingen

Seit August 1968 : verheiratet mit Christa Ober, geb. Wünscher; ein Kind (geb. im Juli 1972)

Juni 1970 : Staatsexamen (Biologie und Chemie)

Juli 1970 : Diplom (Biologie)

September 1970 : Beginn mit der vorliegenden Dissertation unter Anleitung von Prof. Dr. F. Amelunxen am Pflanzenphysiologischen Institut der Georg-August-Universität in Göttingen.

Meine akademischen Lehrer in den Hauptfächern waren die Herren Professoren:
Amelunxen, Ax, Birukow, Brockmann, Ellenberg, Glemser, Heberer, Jacobi, Lorenzen, Pipho, Pirson, Rensing, Schlote, Trebst und Wießner.